

RICARDO CHESSINI BOSE

**PROPOSTA PARA UM SISTEMA DE
RASTREAMENTO E ANÁLISE DE
MOVIMENTOS EM ANIMAIS DE
LABORATÓRIO**

**FLORIANÓPOLIS
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA ELÉTRICA**

**PROPOSTA PARA UM SISTEMA DE
RASTREAMENTO E ANÁLISE DE
MOVIMENTOS EM ANIMAIS DE
LABORATÓRIO**

Dissertação submetida à
Universidade Federal de Santa Catarina
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

RICARDO CHESSINI BOSE

Florianópolis, setembro de 2003

PROPOSTA PARA UM SISTEMA DE RASTREAMENTO E ANÁLISE DE MOVIMENTOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Ricardo Chessini Bose

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título
de Mestre em Engenharia Elétrica, Área de Concentração em
Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final pelo Programa
de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina’

José Marino Neto, Dr.
Orientador

Edson Roberto de Pieri, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica

Banca Examinadora:

José Marino Neto, Dr.
Presidente

Jefferson L. Brum Marques, Ph.D.

Joceli Mayer, Ph.D.

Cilene Lino de Oliveira, Ph.D.

Fernanda Isabel Marques Argoud, Dr.

Aos meus pais
pela confiança e paixão.....

Aos amigos
pela força em todos os momentos.....

PROPOSTA PARA UM SISTEMA DE RASTREAMENTO E ANÁLISE DE MOVIMENTOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Ricardo Chessini Bose

Maior/2003

Orientador: José Marino Neto, Dr.

Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Palavras Chave: Rastreamento, processamento de imagens, comportamento

Número de Páginas: 94

RESUMO:

O registro e a análise do comportamento locomotor e não-locomotor em animais de laboratório são usados em vários estudos de mecanismos farmacológicos/fisiológicos dos efeitos comportamentais de drogas neuroativas. Estas informações de comportamento têm sido registradas cada vez mais através de sistemas automáticos. Embora eficazes, os sistemas disponíveis comercialmente são caros, inflexíveis, e focalizados para estreita gama de características comportamentais. O atual trabalho apresenta um sistema automatizado baseado em processamento de vídeo para o estudo do comportamento locomotor e não-locomotor. Experimentos comportamentais com ratos e pombos, realizados no teste de campo aberto, foram gravados em meio digital com câmera de baixo custo, tipo WEBCAM. O uso de um software, desenvolvido com técnicas de processamento de imagens, possibilita extrair destes registros alguns atributos da imagem do animal (posição do centro de massa, posição angular, e área), com o processamento

individual de cada quadro de vídeo. Um pós-processamento dos dados obtidos é realizado para obter atributos de interesse relativos ao comportamento, incluindo a descrição do rastreamento, a velocidade, distância e orientação do deslocamento, e o tempo de permanência em áreas predeterminadas, entre outros. O usuário final pode controlar a maioria dos critérios de detecção e classificação destes atributos. Uma tabela com os dados resultantes é gravada como arquivo tipo CSV, permitindo sua representação gráfica e análise estatística na maioria dos softwares estatísticos disponíveis comercialmente. Este sistema foi testado em circunstâncias reais de experimento (um estudo sobre os efeitos comportamentais de duas drogas neuroativas, cafeína e haloperidol, administradas em ratos e em pombos de laboratório), provando ser uma ferramenta precisa e útil para laboratórios de neurobiologia comportamental.

A SYSTEM FOR TRACKING AND MOVEMENT ANALYSE OF LABORATORY ANIMALS BASED ON IMAGE PROCESSING

Ricardo Chessini Bose

September / 2003

Advisor: José Marino Neto, Dr.

Area of Concentration: Biomedical engineering

Keywords: Tracking, image processing, animal behavior

Number of Pages: 94

ABSTRACT:

Recording and analysis of locomotor behavior and non-locomotor activities in laboratory animals are usefull in a number of studies on pharmacological/physiological mechanisms and behavioral effects of neuroactive drugs. These behavioral data have been increasingly and successfully recorded by automatic systems; although effective, most of these commercially available systems are expensive, inflexible, and focused on a narrow range of behavioral characteristics. The present work develops an image analysis-based on automated system for the study of locomotor and non-locomotor behaviors. Behavioral experiments with the animal (rats and pigeons) released in an open-field apparatus are recorded in digital media with an inexpensive WEBCAM device. A number of attributes of the animal image (mass center position, angular position, and area) are extracted from these records by a specially developed software that uses image processing techniques that processes individually each frame of the video file. Post-

processing of these raw data is carried out by this software to bring about behavioral attributes of interest, including tracking description, velocity, distance and orientation of locomotion, time spent in predetermined areas, among others. The final user may control these attributes and most of the detection and classification criteria. The resulting data sheet are recorded as CSV files, allowing for graphic representations and statistical analysis in most of the commercially available statistical packages. This system was tested in real experimental conditions (a study on the behavioral effects of two neuroactive drugs, caffeine and haloperidol, in laboratory rats and pigeons) proving itself to be a flexible, accurate and useful tool for behavioral neurobiology laboratories.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. MOTIVAÇÃO	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 OBJETIVOS GERAIS	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 SISTEMA PROPOSTO E SEU DESENVOLVIMENTO	18
4.2 AQUISIÇÃO DE IMAGEM.....	20
4.3 PREPARAÇÃO DOS DADOS PARA PROCESSAMENTO	23
4.4 SEGMENTAÇÃO.....	25
A) SEGMENTAÇÃO DO CORPO DO ANIMAL.....	25
B) SEGMENTAÇÃO DE UMA PARTE DO CORPO DO ANIMAL.....	31
4.5 EXTRAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS	44
A) POSIÇÃO DO ANIMAL.....	44
B) POSIÇÃO DA PARTE PRÉ-ESCOLHIDA DO ANIMAL.....	45
C) DIREÇÃO DO ANIMAL:	45
D) COMPRIMENTO DO ANIMAL	46

E) TAMANHO DO ANIMAL (ÁREA DO ANIMAL)	46
F) NÚMERO DE PIXELS ALTERADOS ENTRE DOIS QUADROS CONSECUTIVOS:	46
4.6 PÓS-PROCESSAMENTO	47
A) TOTAL DE DESLOCAMENTO DO CORPO	47
B) VELOCIDADE MÉDIA DO CORPO	47
C) TEMPO TOTAL DE PERMANÊNCIA DO CORPO NA ÁREA DE INTERESSE	47
D) NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS DO CORPO NA ÁREA DE INTERESSE	48
E) NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS DA PARTE ESCOLHIDA DO ANIMAL, NA ÁREA DE INTERESSE	48
F) DESLOCAMENTO TOTAL DA PARTE ESCOLHIDA	48
G) SOMATÓRIO DAS DISTÂNCIAS ENTRE CORPO E A PARTE ESCOLHIDA	48
H) DESLOCAMENTO TOTAL ANGULAR DO CORPO EM SENTIDO HORÁRIO E DESLOCAMENTO TOTAL ANGULAR DO CORPO EM SENTIDO ANTIHORÁRIO	49
I) CLASSIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO	49
J) NÚMERO TOTAL MUDANÇAS DE COMPORTAMENTO	50
K) NÚMERO TOTAL DE PIXELS ALTERADOS	50
5. A FERRAMENTA DE SOFTWARE DESENVOLVIDA	51
5.1 ETAPA DE PREPARAÇÃO	51
5.2 PROCESSAMENTO DO VÍDEO	54
5.3 PÓS-PROCESSAMENTO	55
5.4 OUTRAS FUNÇÕES	57
6. TESTES DO SISTEMA	59
6.1 ERRO DE PERSPECTIVA NAS SITUAÇÕES DE EXPERIMENTO	59
6.2 LIMITAÇÃO DOS SOFTWARES DE COMPACTAÇÃO PARA USO NO SISTEMA	62
6.3 TESTES COM O SOFTWARE DESENVOLVIDO	63

6.3.1 SEGMENTAÇÃO DO CORPO	63
6.3.2 TAMANHO DO ANIMAL POSSÍVEL DE SEGMENTAÇÃO	64
6.3.3 SEGMENTAÇÃO DA PARTE ESCOLHIDA	64
6.3.4 SEGMENTAÇÃO DA PARTE ESCOLHIDA COM O USO DE UM MARCADOR.....	65
6.3.5 TESTE DA ETAPA DE PÓS-PROCESSAMENTO.....	66
6.4 TESTE EM SITUAÇÃO EXPERIMENTAL: O EFEITO DE DROGAS NEUROATIVAS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E NÃO-LOCOMOTORA EM RATOS COLOCADOS EM UM CAMPO ABERTO...	67
7. DISCUSSÃO.....	74
8. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Equipamento de registro por infravermelho (ActiMot - TSE-Technical & Scientific Equipment, Bad Homburg, Germany)	8
Figura 2 - Sistema de básico de registro baseado em vídeo.....	11
Figura 3 - Diagrama em blocos do sistema proposto	19
Figura 4 – Fluxograma que representa a etapa de preparação	24
Figura 5 – Exemplo de aplicação do método por subtração de plano de fundo	29
Figura 6 – Apresentação de 5 diferentes valores de limiarização. a) Limiar igual a 0; b) Limiar igual a 25; c) Limiar igual a 50; d) Limiar igual a 100; e) Limiar igual a 125; f) Limiar igual a 150; g) Limiar igual a 175.....	30
Figura 7 – Exemplo de <i>imagem padrão</i> definida sobre a cabeça do animal	32
Figura 8 - Processo de mapeamento estatístico usado no rastreamento de uma parte escolhida do animal.....	33
Figura 9 - Procura por áreas semelhantes através de método estatístico. a) Área pré-escolhida de 32x32 pixels sobre a cabeça do animal; b) Alguns pontos que apresentam mesmos valores de variância da área pré-escolhida. c) O mapeamento tridimensional das áreas de maior semelhança com a cabeça, através do método estatístico. A maior semelhança com a <i>imagem padrão</i> é 255 e a menor é 0.	35
Figura 10 - Possibilidades de rotação do objeto de interesse. a) Sem rotação; b) Rotação lateral; c) Rotação longitudinal	38
Figura 11 - Exemplo de banco de imagens com quatro rotações.	38
Figura 12 - Procura por áreas semelhantes através de método por correlação. a) Área escolhida de 32x32 pixels sobre a cabeça do animal como <i>imagem padrão</i> ; b) Ponto marcado que apresenta maior semelhanças com área escolhida; c) Distribuição de semelhança entre a área escolhida e todo o corpo do animal.....	39
Figura 13 - Fluxograma que representa a etapa de processamento	41
Figura 14 – a) e b) Formas tridimensional e bidimensional da distribuição da semelhança entre a imagem da cabeça do animal e sua correlação com o animal; c) <i>Imagem padrão</i> limitada pelo quadrado, em um quadro do filme; d) Quadro em outro ponto do filme, no qual foi	

realizado o mapeamento da correlação com a <i>imagem padrão</i> , visto a) e b)	43
Figura 15 - O ângulo geral do corpo é dado pela média dos ângulos das N_d maiores retas geradas, que atravessam o corpo do animal e por 180° em intervalos de 1°	45
Figura 16 - Parte da etapa de preparação, escolha do limiar de segmentação	52
Figura 17 - Parte da etapa de preparação, calibração do programa	53
Figura 18 - Parte da etapa de preparação, escolha da parte de interesse a ser rastreada	54
Figura 19 - Etapa de processamento, durante o qual os resultados do rastreamento são exibidos.	55
Figura 20 - Parte da tela da etapa de pós-processamento	56
Figura 21 - Exemplo de uma imagem de teste de perspectiva com gabarito formado por retas de tamanho e distâncias conhecidas, disposto ao longo do eixo horizontal da imagem	60
Figura 22 - Mostra pombo marcado com triângulo de papel preso a cabeça para facilitar rastreamento	65
Figura 23 - Objeto e a arena de teste de parâmetros, utilizados para o teste da etapa de pós-processamento.	66
Figura 24 – Rastreamento de um animal, em um teste de campo aberto, que recebeu a administração de Haloperidol. a) O animal e uma área de interesse central; b) O rastreamento de animal durante o teste.	69
Figura 25 - Rastreamento de um animal, em um teste de campo aberto, que recebeu a administração de Cafeína. a) O animal e uma área de interesse central; b) O rastreamento de animal durante o teste.	70
Figura 26 – Gráfico de deslocamento dos animais ao longo do teste.	70
Figura 27 – Gráfico de pixels alterados dos animais ao longo do teste.	70
Figura 28 - Gráficos das distribuição de deslocamento dos animais ao longo do teste. a) Deslocamento do animal tratado com Haloperidol pelo centro da arena; b) Deslocamento do animal tratado com Cafeína pelo centro da arena; c) Deslocamento do animal tratado com Haloperidol pela periferia da arena e d) Deslocamento do animal tratado com Haloperidol pela periferia da arena.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

APS – “Active Pixel Sensor”

AVI – “Audio Video Interleave”

BMP ou BITMAP - mapa de bits.

CCB – Centro de Ciências Biológicas

CCD – “Charge Coupled Device”

CSV – “Comma Separate Value”

FPS – “Frames per second”

LNFI – Laboratório de Neurofisiologia

MPEG – “Moving Picture Experts Group”

P&B – Preto e Branco

RGB – “Red Green Blue”

SAD – “Sum of the absolute differences”

SSD – “Sum of the squared difference”

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

USB – “Universal Serial Bus”

1. INTRODUÇÃO

Um conjunto de disciplinas das Neurociências (Neurofisiologia, Psicologia e Farmacologia) estuda os efeitos de drogas sobre o comportamento animal com o objetivo de verificar os mecanismos de ação das mesmas ou como ferramenta para elucidar um processo neuroquímico desconhecido. Particularmente em investigações do sistema nervoso ou de certas classes de drogas, informações importantes podem ser obtidas pelo estudo de uma grande variedade de comportamentos. Dentre estes está incluído a análise de comportamentos espontâneos, motivados, modificados por processos de aprendizado, atenção, memória, entre outros (Kelly et al., 1986).

Drogas psicoativas e manipulações do tecido neuronal alteram freqüentemente e diferentemente itens motores na atividade geral do animal (andar, comer, cheirar, coçar, dormir, etc). Os itens podem ser alterados de forma isolada ou combinada, o que dificulta a distinção destes dentre os processos afetados pela droga. Por exemplo: o comportamento de autolimpeza (grooming), em ratos, parece ser relacionado à manutenção tegumentar (contra ectoparasitas e micro-organismos na pele), a termorregulação e a sinais de socialização, entre outros. Assim, diante de uma alteração no comportamento de autolimpeza, existe dificuldade em distinguir qual ou quais os processos foram alterados pela droga (Vos et al., 1998).

Outro exemplo é o efeito de drogas bloqueadoras dos receptores para o neurotransmissor dopamina. Drogas dopaminérgicas são usadas na clínica como antipsicóticos, e costumam provocar considerável ganho de peso. Este fato sugere que tais medicamentos, entre outros efeitos, aumentam o apetite. Analisando

concomitantemente os aspectos ingestivos e o comportamento exploratório após o tratamento com estas drogas, Baldo et al. (2002) propõem que o ganho de peso possa ser devido uma diminuição de frequência de mudanças entre um comportamento e outro. Neste trabalho foi observado que, um animal inicia o comportamento de comer permanece comendo mais tempo, o que o leva a ganho de peso. Dessa forma, o aumento de ingestão de alimento se deve a um fenômeno motor, e não à perturbação do apetite (fenômenos distintos). Assim, quanto mais informações sobre o comportamento geral do animal forem obtidas, maiores são as possibilidades de se identificar aspectos alterados pó drogas ou pela manipulação neuronal, e maiores são as possibilidades de melhor entendimento de sua ação.

Alguns comportamentos e atividades são mais estudados que outros, por demonstrarem mais facilmente os efeitos de alguns grupos de drogas, ou por maior facilidade de observação, registro e análise dos seus componentes. Como exemplo, existe um teste que é realizado com alimento colocado no centro de uma arena circular. Ratos privados de comida são soltos na sua periferia e é medido o tempo que o animal leva para encontrar a comida. O experimento ajuda a identificar drogas de efeito ansiolítico, pois ratos sob ação dessas drogas chegam mais rápido ao alimento do que animais não submetidos às drogas (Rex et al., 1997). O teste indica uma condição de conflito no animal, que deve ir ao centro da arena (elemento aversivo) para obter comida (elemento reforçador). O tempo, de fácil observação, é a medida de interesse.

De especial importância para o presente trabalho são os métodos disponíveis para medição e análise de atividades motoras e de exploração, como por exemplo: o teste do campo aberto ou "OpenField" (Nahas, 1999; Prut e Belzung, 2003), o teste do labirinto aquático de Morris (Grossmann e Skinner, 1996), a

labirinto em cruz ou “Plus Maze” (Boguszewski e Zagrodzka, 2002) e o teste da caixa clara e escura (Bourin e Hascoët, 2003). Esses métodos têm contribuído no entendimento do efeito de drogas ansiolíticas e seus substratos neurais subjacentes.

O entendimento de um mecanismo neural pode ser obtido por uma análise do efeito de drogas sobre circuitos neurais, e da observação dos comportamentos afetados. Circuitos neurais que mediam vários aspectos da locomoção e da exploração utilizam neurotransmissores que são afetados por drogas de diferentes classes (Kelly, 1993). Apesar de sua observação ser amplamente utilizada, a locomoção é de difícil notação, o que incentivou o desenvolvimento de vários sistemas automáticos de registro para este comportamento. A técnica de aquisição de informação do comportamento empregada em um experimento é essencial para compreender quais componentes da atividade contribuem para demonstrar a ação da droga (Reiter e Macphail, 1979). Por exemplo: a Anfetamina e a Apomorfina aumentam a atividade locomotora em roedores. Porém, a Anfetamina aumenta a frequência de imersão de suas cabeças ou rostos em buracos espalhados pela arena (“holepokes”), enquanto a Apomorfina diminui sua frequência. Por conhecer a técnica empregada, sabemos que a frequência de emergir nos buracos é uma medida de atenção do animal. Logo, é concluído que a Anfetamina e Apomorfina atuam de forma contrária sobre a atenção do animal (Geyer et al., 1986), embora ambas aumentem a atividade locomotora.

Uma série de métodos e medidas experimentais de comportamento locomotor são utilizadas nas Neurociências. O teste do campo aberto (“Open Field”), utilizando roedores, é amplamente adotado e utilizado para quantificar a ação entre diferentes drogas psicoestimulantes e ansiolíticas (Rex et al., 1997, Garza e

Cunningham, 2000, Prut e Belzung, 2003). Os animais são colocados em um ambiente desconhecido que consiste de uma arena de formato variável (circulares, retangulares, etc). O piso da arena é dividido em regiões regulares, demarcadas de modo que seja possível a um observador verificar sobre qual quadrante o animal se encontra. O comportamento locomotor é quantificado toda vez que o animal cruza os limites entre as regiões demarcadas, gerando informações de sua posição no tempo. O tempo de permanência no quadrante, a frequência com que o animal passa por cada área, a mudança de direção, a distância percorrida, a velocidade da locomoção, o tempo total de locomoção, o tempo total parado, entre outros, também são informações obtidas a partir da locomoção animal ao longo do experimento.

Comportamentos não-locomotores como cheirar ("sniffing", o animal fica ereto sobre as patas traseiras, cheirando o ambiente), coçar, manobras de limpeza, integração social e atividade sexual também são registradas. Neste caso, é registrado o número de ocorrências destes comportamentos ao longo do experimento (Nahas, 1999). Obtidos estes dados, é possível comparar o comportamento entre animais sob efeito de diferentes drogas. Por exemplo, em um experimento, foram aplicadas D-anfetamina, cocaína, cafeína e o veículo dessas drogas, em ratos expostos ao teste de campo aberto (Antoniou et al., 1998). Os animais receberam diferentes doses das drogas e foram registradas as características de alguns comportamentos durante o teste, como o tempo em que permaneceu parado, o tempo em locomoção e o tempo de imobilidade tônica; o número de vezes que cheirou o chão, que cheirou o ar, que efetuou auto-limpeza, que se coçou, que balançou a cabeça e que se lambeu. No final do experimento foi obtida uma caracterização da atividade geral dos animais para a ação de cada droga. Na análise dos resultados foi observado que as três substâncias aumentam a

atividade geral do animal. Entretanto, a d-anfetamina e a cocaína aumentam de forma dose dependente (quanto maior a dose maior a atividade), enquanto que a cafeína tem distribuição tipo sino (aumenta a atividade com o aumento da dose, mas perde o efeito em altas doses). Outras conclusões sobre as mesmas poderiam ser determinadas se houve maior número de variáveis conhecidas dos comportamentos, o que melhoraria a análise e caracterização da ação destas drogas.

Em outros testes, a trajetória feita pelo animal também é um fator importante. Por exemplo, o labirinto aquático de Morris foi um teste desenvolvido para observar padrões de aprendizagem espacial e memorização em ratos, como função de patofisiologias e variáveis do ambiente (Grossmann e Skinner, 1996). Acredita-se que a habilidade para aprendizado espacial requerida no desempenho da tarefa, dependa fortemente da função do hipocampo (região do cérebro). Ratos são nadadores por natureza; soltos em um ambiente cheio de água, aprendem a nadar diretamente até uma plataforma suspensa, a partir de qualquer ponto de partida em que seja colocado. Supõe-se que ele recorde a localização espacial fixa relativa à distância no ambiente. A principal medida neste teste é o tempo que o animal leva para achar a plataforma em referência ao ponto em que foi solto.

Em geral, os parâmetros comportamentais de interesse do comportamento são obtidos por um observador/pesquisador que toma nota do que observa, em um protocolo de papel, momento a momento, durante todo o experimento. São os denominados "métodos de observação direta", e podem ser feitos no momento do experimento ou sobre experimentos gravados em vídeo. O pesquisador observa o andamento do experimento e simultaneamente toma nota das observações. Existe a possibilidade de perda de informação no momento de tomar nota. Esta

possibilidade é ampliada pela fadiga após horas de observação contínua, além de ser difícil ao pesquisador identificar e anotar todos os aspectos manifestados emitidos pelo animal simultaneamente. Os parâmetros para a classificação dos movimentos são arbitrados pelo pesquisador, o que pode acarretar em resultados variáveis, se outro observador/pesquisador realizar o mesmo experimento. Dificilmente o observador conseguirá registrar mais de um experimento ou mais de um animal ao mesmo tempo. Além disso, comportamentos ou movimentos sutis podem não ser percebidos e quantificados. Diante destas limitações, vários sistemas automáticos de observação e registro têm sido desenvolvidos.

É possível dividir os sistemas automáticos de registro de comportamento em dois grupos: os sistemas de registro de movimentos locomotores e os sistemas de registro de movimentos não-locomotores. Os movimentos locomotores são os deslocamentos entre um ponto e outro da arena; os movimentos não locomotores são aqueles que o animal pode realizar sem ter necessariamente que se deslocar, por exemplo: abrir as asas, girar a cabeça, coçar, abrir a boca, cheirar, etc.

Foram desenvolvidas (e estão disponíveis no mercado) diversas técnicas para registro e análise dos movimentos locomotores. Estas técnicas incluem o uso de fotocélula (Schwartz et al., 1993), de sensores de ultra-som (Spink et al., 2001), de plataformas com sensores mecânicos no piso, como: roletes (Schwartz et al., 1993), esferas (Schwartz et al., 1993; Spink et al., 2001) ou placas (Spink et al., 2001); de sistemas baseados em raios infravermelho (Fitzgerald et al., 1988; Kafafi et al., 2001; Brudzynski et al., 1997) ou em vídeo (Schwartz et al., 1993; Sams-Dodd, 1995; Spink et al., 2001; Schwarz et al., 2002).

Os sistemas por ultra-som ou fotocélulas possuem sensores posicionados sobre a arena e geram um sinal sempre que o animal se move. Porém, estes

sistemas não são capazes de indicar a posição do animal, apenas indicam se há movimento. As plataformas com sensores mecânicos utilizam placas ou roletes ou esferas distribuídas no piso da arena para identificar a posição do animal. O animal que se desloca sobre a arena toca em alguns desses elementos, os quais geram sinais que informam a posição do animal. Os sinais são condicionados, digitalizados e registrados em um microcomputador junto com a informação de tempo do momento do registro. Os sistemas por plataformas possuem o aspecto negativo de usarem elementos que interferem no deslocamento natural do animal, gerado pelo desconforto de pisar em um elemento móvel, alternando sinais tácteis e proprioceptivos no animal em experimento.

Um dos sistemas mais utilizados, e que preserva os diversos elementos do comportamento espontâneo do animal, é o sistema de registro de movimentos locomotores baseado em raios infravermelhos (Fitzgerald et al., 1988; Kafkafi et al., 2001; Brudzynski et al., 1997), como o equipamento mostrado na Figura 1. Este sistema é constituído de vários elementos emissores e receptores de infravermelho, que são distribuídos a cada 2,54 cm (1 polegada) pelas laterais da arena de experimento e próximos ao piso. Os elementos emissores são colocados em uma lateral e os elementos receptores na lateral oposta, o que possibilita a monitoração de toda a arena.

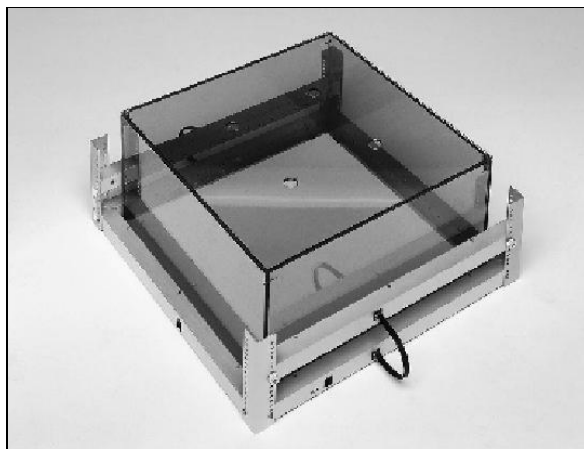


Figura 1 Equipamento de registro por infravermelho (ActiMot - TSE-Technical & Scientific Equipment, Bad Homburg, Germany)

Quando um animal é colocado na arena, seu corpo interrompe um ou vários raios. Um circuito condicionador de sinais identifica a posição dos sensores que tiveram seu sinal interrompido. A informação é transmitida a um computador, onde um software registra a posição do animal e o instante da ocorrência. Este valor registrado de posição é dado pela média das posições interrompidas em um instante. Por exemplo, se as posições 210 cm, 215 cm e 220 cm no eixo x da arena foram identificadas, a informação registrada como a posição do corpo do animal será o ponto 215 cm. Além de registrar a posição do animal, os softwares de registro processam as informações recebidas e extraem outras informações do animal em experimento, tais como: distância percorrida, velocidade de deslocamento e tempo de permanência dentro de uma área de interesse pré-estabelecida. Além disso, por empregar fonte luz invisível para os ratos, estes sistemas podem trabalhar em ambientes escuros, como condições de experimento. Isto pode ser uma vantagem em experimentos com roedores que possuem hábitos noturnos. Outra característica destes sistemas é a possibilidade de identificar a presença e a posição do animal em diferentes alturas da arena. Os emissores e receptores são distribuídos em alturas desejadas e próximos ao piso. Esta capacidade é bastante valorizada, pois

possibilita o registro do comportamento de “rearing” (comportamento de ficar ereto sobre as patas traseiras, cheirando o ambiente) em roedores, muito relevante no comportamento geral desses animais.

Normalmente, as arenas são construídas com materiais transparentes e encaixadas dentro de uma armação que contém as fileiras de emissores e receptores, já distribuídos e fixados. Os sistemas baseados em raios infravermelhos apresentam precisão mediana se comparada com sistemas baseados em vídeo. Possuem normalmente uma definição de 1,27 cm, o que os tornam insensíveis a movimentos corporais discretos. Esta característica penaliza este tipo de sistema, pois limita sua capacidade de gerar mais informações sobre o experimento, o que pode ser decisivo para o conhecimento da ação de uma droga. O registro da atividade é feito durante o experimento, e no caso de um erro de análise, o experimento terá de ser refeito integralmente. Além disso, apenas um animal por vez pode ser acompanhado na mesma arena. Os custos destes sistemas são considerados acessíveis, apesar de não existirem fabricantes no Brasil.

Outros sistemas de registro de movimentos locomotores, cada vez mais empregados e que preservam melhor o comportamento espontâneo do animal, são aqueles baseados em vídeo (Grossmann e Skinner, 1996; Schwarting et al., 1993; Sams-Dodd, 1995; Spink et al., 2001; Schwarz et al., 2002). Estes sistemas ganharam força com o avanço tecnológico dos microcomputadores, e partem do processamento de imagens dos experimentos registradas em vídeo para extrair as informações de locomoção do animal. Uma câmera é normalmente posicionada sobre uma arena (ver a figura 2), e adquire imagens do animal, que são registradas em um aparelho de vídeo- cassete e digitalizadas em uma placa de conversão em um microcomputador. A imagem digitalizada é processada em um software de

processamento de imagem, que obtém a informação de posição do animal dentro da arena, registrada juntamente com a informação de tempo.

Como no sistema anterior, o software de processamento de imagem extrai outras informações dos dados obtidos do experimento (velocidade, distância percorrida, etc). O processamento pode ser feito *on-line* (enquanto está ocorrendo o experimento) ou *off-line* (após o término do experimento).

A definição de posição nos sistemas baseados em vídeo é muito boa se comparada com o sistema por infravermelho; pois os dados de locomoção são mais detalhados e enriquecem as informações sobre o experimento. Há a possibilidade do acompanhamento de mais de um animal por vez, na mesma arena, o que favorece a observação de aspectos sociais entre os animais. Possibilita ainda o acompanhamento do teste através da exibição das imagens na tela do microcomputador, sem interferência no experimento. O registro em vídeo possibilita a veiculação e a divulgação dos testes, e as aplicações que exigem ausência de luz visível podem ser implementadas com o uso de câmeras que trabalham na faixa de infravermelho. Mas este tipo de sistema ainda apresenta um custo muito elevado, em especial pela necessidade de emprego de câmeras de vídeo e de softwares complexos de processamento.

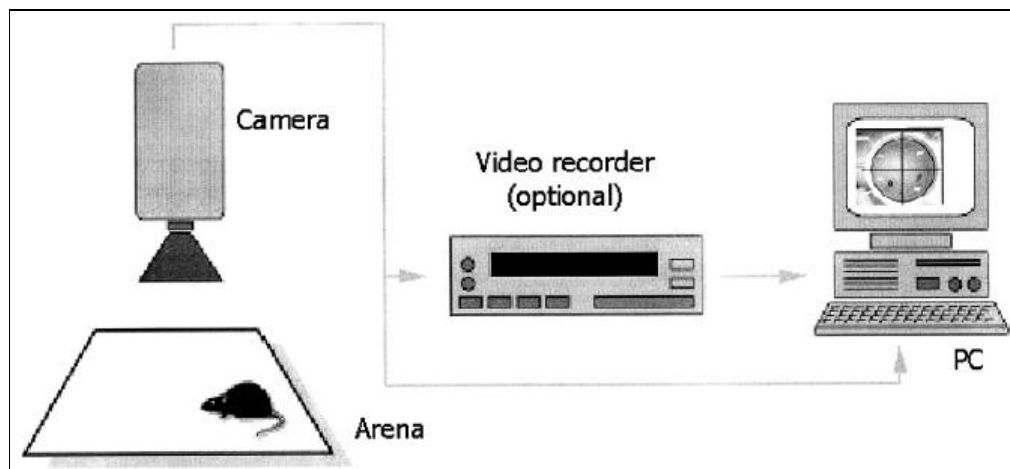


Figura 2 - Sistema de básico de registro baseado em vídeo

É interessante notar que os sistemas de registro de movimentos locomotores, em geral, não permitem o registro de movimentos não-locomotores, e vice-versa. Assim, outros sistemas foram desenvolvidos para o registro de movimentos não-locomotores. Estes movimentos podem incluir desde movimentos simples como o tremor, até atividades mais complexas como cheirar ou fazer autolimpeza. O registro de tremores, por exemplo, é relevante no estudo de modelos animais para síndrome de Parkinson (Chassian et al., 2001). Uma recente publicação propõe um sistema para registro de tremor baseado em plataforma de força (Fonseca et al., 2002): o piso é apoiado em sensores de efeito piezzo-elétrico, que mede as componentes de força que o animal exerce sobre o piso. Da variação das componentes são obtidas as informações de intensidade e frequência do tremor.

Outro exemplo de movimento não locomotor é o movimento de mastigação e ação do maxilar de animais, ponto enfocado em diversas áreas como Zoologia e Odontologia, onde são aplicadas técnicas como a medição de atividade muscular por EMG (eletromiograma) dos músculos responsáveis pelo movimento da boca em aves (Gennip e Berkhoudt, 1994) e sistemas baseados em sensores de efeito Hall

colocados nas extremidades da boca de ratos (Koga et al., 2001). Normalmente essas técnicas e soluções foram desenvolvidas com a finalidade estrita de registrar os movimentos localizados e as atividades de interesse focalizadas.

Existe uma tendência, nos últimos anos, para uso de medidas indiretas das atividades não-locomotoras como forma de registrar os comportamentos de maneira mais genérica, sem depender de soluções exclusivas para cada comportamento. Por exemplo, Chassian et al., 2001, propõem a inclusão da observação da quantidade de pixels (pontos que formam a imagem digital) alterados entre um quadro e outro do vídeo do experimento. Este valor é associado às informações comumente obtidas pelos softwares de registro de movimentos locomotores (distância percorrida, velocidade de deslocamento, etc.) que resultam em um índice da atividade do animal. Apesar da quantidade de pixels alterada não significar a medida de um movimento em especial, este pode traduzir um quadro geral da atividade do animal, incluindo a atividade locomotora e não-locomotora.

Outro exemplo de caminho seguido para a obtenção de informação do comportamento não locomotor é encontrado em um estudo sobre a dor em ratos (Jourdan et al., 1999). Foi observado que os comportamentos de lambar, morder e o de autolimpeza destes animais podem ser relacionados com o nível de dor a que são submetidos. Um rastreamento foi executado em experimento de exploração com ratos, quando era totalizado o tempo que o animal permanecia em movimentos de locomoção ou rotação de longa duração. O tempo total do experimento diminuído tempo referente aos movimentos longos, foi atribuído ao tempo de ocorrência dos comportamentos de lambar, morder e autolimpeza; e este período tomado como medida indireta de dor no animal.

Nestes casos, a medida indireta consegue quantificar o comportamento não locomotor de forma mais genérica. Estas propostas possibilitam que uma mesma solução seja aplicada em diversos tipos de experimento.

Medidas dos movimentos locomotores e não-locomotores em um mesmo sistema podem contribuir no estudo e caracterização da ação de drogas de forma mais eficiente, devido ao aumento das informações extraídas do experimento.

2. MOTIVAÇÃO

Nos últimos 8 anos, o laboratório Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (LNFI), tem investigado o papel de circuitos neurais dotados de receptores serotoninérgicos e catecolaminérgicos na ingestão de alimentos e no balanço energético em animais (Dario et al., 1996; Brum et al., 1999; Neves et al., 2000; Brum et al., 2001; Silva et al., 2003). Nesses experimentos estão sendo usados pombos (*Columba livia*), que se mostraram sensíveis aos efeitos ingestivos e metabólicos de drogas serotoninérgicas. Outros autores (Barret et al., 1994; Gleeson et al., 1992; Kleven e Keok, 1999; Koek et al., 1998) também notaram que estes animais podem também ser excelentes modelos em testes de drogas efeito anticonflito. Este efeito em pombos é observado por meio de comportamentos ingestivos punidos, que consiste no comportamento de bicar um disco para liberar alimento, em animais privados de alimento por 24 horas ou mais. Durante o experimento, o “bicar o disco” por 30 vezes é seguido por apresentação de alimento (fator de reforço) ao animal. Nas próximas 30 bicadas é aplicado um choque elétrico em seu púbis (fator punido), e assim sucessivamente. Isto leva o animal a uma situação de conflito, entre o desejo de comer, e a aversão ao choque. Animais sob efeito anticonflito induzido por tais drogas demoram menos para bicar novamente o disco, e diminuem o período entre as bicadas durante o intervalo de 30 bicadas que precedem o choque.

Contudo, também foi demonstrado que estas drogas provocam um aumento na busca por comida, se comparado com animais que recebem veículo. Isto indica a necessidade do desenvolvimento de outros modelos experimentais de ansiedade que

não envolvam a privação de alimentos, já que a forma atual não evidencia se o aumento na frequência de bicadas durante os testes punidos é atribuído a um efeito anticonflito ou a um efeito hiperfágico das drogas.

Uma linha de pesquisa que vem sendo abordada é a observação dos comportamentos locomotores e de exploração dos animais em experimento. No pombo, os aspectos não-locomotores do comportamento possuem grande importância na sua atividade geral, em especial os movimentos relacionados ao deslocamento da cabeça do animal. Nos experimentos em andamento tem sido aplicado o método de observação direta para a extração de informação do comportamento. Como descrito anteriormente, são conhecidas as dificuldades do uso de tal método, justificando a aplicação de métodos automatizados de registro. No entanto, os métodos automatizados de registro conhecidos não satisfazem os requisitos desta pesquisa por desconsiderarem os aspectos não-locomotores do movimento. Esta deficiência indica a necessidade do desenvolvimento de um sistema automatizado de registro de comportamento animal com capacidade de extração de aspectos locomotores e não-locomotores. Em especial, um sistema que permita quantificar o deslocamento de uma parte do corpo do animal, neste caso, a cabeça do pombo. Além disso, é desejado que o sistema possua baixo custo quando comparado aos disponíveis no mercado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho é o de construir um sistema de registro de atividade locomotora de animais, baseado em processamento de vídeo, com baixo custo, para o auxílio de pesquisas nas áreas de Neurofisiologia e farmacologia, que necessitam da análise comportamental de animais a partir de medição da relação posição/tempo de seu corpo ou de uma parte deste, durante o experimento. As informações obtidas deverão permitir pós-processamento e apresentação na forma de planilha em formatos exportáveis para programas estatísticos.

3.2 Objetivos específicos

O sistema também deve incluir funções que possibilitem:

- ♣ A análise do deslocamento do corpo do animal
- ♣ A análise do deslocamento de parte do corpo do animal
- ♣ A extração do número de pixels alterados e sua totalização.
- ♣ A particularização dos dados de rastreamento em áreas de interesse.
- ♣ As totalizações parciais periódicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram identificadas, junto aos pesquisadores do LNFI, as características e funções que um sistema de registro de comportamento locomotor deve conter. O sistema de registro deve ser automatizado e possuir baixo custo, ser capaz de gerar registros dos experimentos em arquivos digitais de vídeo e possuir as seguintes funções:

- a) Rastreamento e análise do deslocamento do corpo do animal, com a extração das características de posição do corpo do animal, posição angular, área e comprimento do corpo; e as totalizações de deslocamento, de deslocamento angular, além da velocidade média de deslocamento.
- b) Rastreamento e análise do deslocamento de parte do animal, com a extração das características de posição da parte e totalização da distância entre parte e corpo.
- c) Discriminação do movimento em eventos locomotores, não-locomotores, imobilidade e totalização do número de vezes que o evento é alterado (mudança de comportamento).
- d) Particularização dos dados de rastreamento em áreas de interesse na arena, com a totalização do número de entradas do corpo nas áreas, do tempo de permanência do corpo nas áreas, do deslocamento do corpo nas áreas, do número de entradas de parte do corpo nas áreas; e a discriminação dos eventos locomotores, não-locomotores e imobilidade do corpo nas áreas.

e) Extração do número de pixels alterados e sua totalização.

Além disso, deve permitir uma totalização parcial das variáveis obtidas para cada função, em períodos de tempo escolhidos.

O sistema também deve ser adequado à metodologia empregada atualmente nos experimentos em andamento no LNFI, no qual o pesquisador coloca o animal dentro da arena de teste e aciona uma câmera de vídeo portátil (JVC modelo GR-AX247) posicionada sobre o experimento, que registra a atividade do animal em fita VHS. O pesquisador sai do ambiente de experimento e fecha a cabine, o que deixa o animal isolado ao longo do teste. No término do experimento, o pesquisador entra na cabine, desliga a câmera e transporta o animal ao biotério. O experimento é repetido com vários animais, individualmente, em sessões com duração média de 15 minutos. Posteriormente o pesquisador assiste cada segmento de gravação, enquanto observa e toma nota manualmente dos aspectos de movimentos relevantes. O experimento é finalizado com a digitação dos dados obtidos em planilhas eletrônicas, para posterior análise estatística.

4.1 Sistema proposto e seu desenvolvimento

Foi projetado um sistema de registro baseado em processamento de vídeo, que, além das vantagens comentadas no capítulo 1, é flexível e pode conter quantos algoritmos forem necessários para executar as funções desejadas pelos pesquisadores, colocadas no item anterior.

O sistema de registro de movimentos de animais de laboratório faz uso de técnicas de rastreamento e pode ser classificado como um sistema de visão computacional ou visão artificial (Marques Filho e Vieira Neto, 1999), pois obtém informações do animal a partir do processamento de um filme do experimento. O

arquivo de vídeo é fragmentado em quadros, que são submetidos individualmente a um processamento de imagem, que localiza o animal ou parte deste na imagem e extrai informações pertinentes. A função de “seguir” um objeto quadro a quadro é denominada de “rastreamento” ou “tracking”.

O sistema proposto é formado basicamente por dois elementos: um equipamento de aquisição de vídeo e um software de rastreamento e processamento de dados.

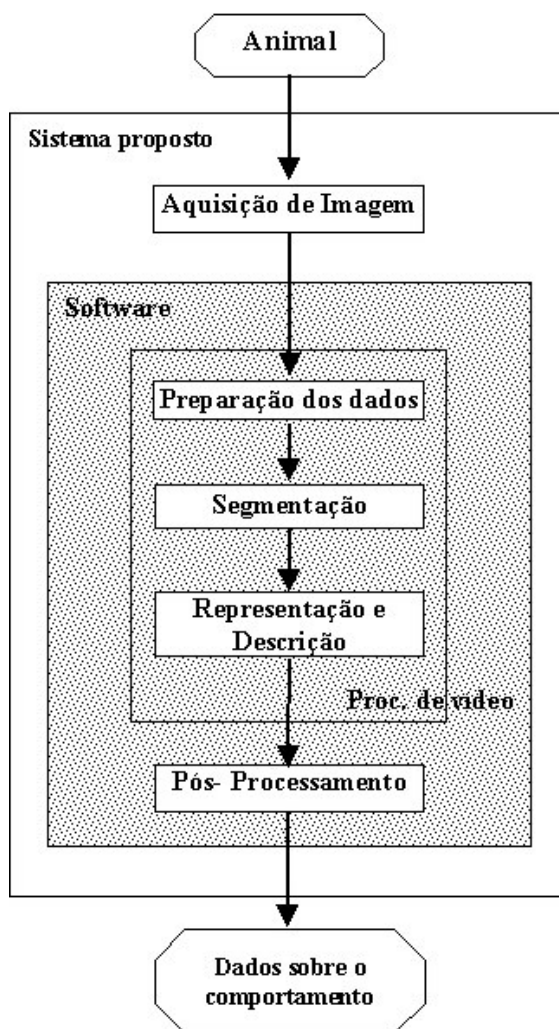


Figura 3 - Diagrama em blocos do sistema proposto

Para melhor entendimento da metodologia empregada no desenvolvimento do sistema, suas funções foram divididas em blocos, baseados na divisão de um sistema de processamento de vídeo normalmente encontrada na literatura (Gonzales e Woods, 1992; Marques Filho e Vieira Neto, 1999), que, porém, foi adaptada à realidade deste trabalho, como é mostrado na Figura 3.

A etapa de aquisição de imagem é implementada por um elemento de aquisição e as demais etapas (pré-processamento, segmentação, representação e descrição, e pós-processamento), através do software desenvolvido, apresentado no item capítulo 5, sobre a ferramenta de software desenvolvida.

4.2 Aquisição de imagem

Nesta etapa é feita a aquisição das imagens, que resulta em um arquivo de vídeo do experimento a ser processado nas próximas etapas do sistema.

No desenvolvimento do sistema de vídeo, foram levados em conta os custos dos seus componentes (câmera de vídeo, gravador, placa de digitalização, microcomputador e software para processamento), em especial o equipamento de aquisição de vídeo.

Câmeras portáteis de uso doméstico são de fácil aquisição, costumam ser baseadas em sensores tipo CCD – “Charge Coupled Device” (Texas Instruments, 2002), de alta qualidade de imagem, e possuem muitos recursos ópticos e eletrônicos. No entanto, seu custo é elevado e não permite entrada direta no computador (requer uma placa de aquisição). Outros tipos de câmeras disponíveis são equipamentos voltados para o uso em vigilância, também baseadas em sensores tipo CCD. Possuem um conjunto óptico simples e também não permitem entrada direta no computador. Apesar de possuem custo acessível, não são encontradas com

facilidade no mercado. Estes fatores motivaram a escolha de um sistema de aquisição baseada em câmeras concebidas para uso junto ao computador. São denominadas WEBCAMs ou “CameraPC”, e foram desenvolvidas como acessório de informática para entretenimento e diversão. Elas são baseadas em sensores tipo APS – “Active Pixel Sensor” (National, 2000), são de baixo custo e de fácil aquisição. Trabalham sempre conectadas a um computador e possuem somente ajustes de foco como recurso óptico .

As características das câmeras WEBCAM passaram a nortear algumas das concepções do sistema desenvolvido. A conexão entre câmera e computador é por porta USB. As imagens são adquiridas de forma digital, o que dispensa o uso de placas de digitalização de vídeo. Os softwares de aquisição que acompanham as câmeras possuem recursos de aquisição de imagem, ajustes de cor (contraste, brilho, etc.), e compactação das imagens em arquivos de vídeo, o que possibilita armazenar filmes como arquivos digitais diretamente no computador. Os filmes podem ser gravados em formatos conhecidos de vídeo (avi, mpeg, etc.) que facilitam sua reprodução, cópia e veiculação.

A adoção da WEBCAM simplificou a implementação do sistema de rastreamento, pois o reduziu a um equipamento de aquisição e um software de processamento de imagem. Durante o desenvolvimento do trabalho foi usada uma câmera WebCamPLUS (Creative Labs, USA) e seu software de aquisição de vídeo. A câmera é posicionada sobre a arena de teste, dentro de uma cabine de experimentos e conectada ao computador externo a ela. O pesquisador pode alterar os parâmetros da imagem recebida (brilho, contraste, etc.) para melhorar a visualização do experimento no filme. Após estes ajustes, o animal é colocado na

área e é iniciada a gravação do filme. Ao final do experimento, o pesquisador finaliza a filmagem e pode seguir para a etapa de processamento.

Apesar de simples, o uso da WEBCAM mostrou, no contexto experimental durante os testes do sistema, limitações e vantagens. As imagens adquiridas pela WEBCAM possuem tamanhos limitados, geralmente entre 360x240 pixels e 640x480 pixels, e não dispõem de conjunto óptico com zoom. Logo, para enquadrar todo o experimento com bom aproveitamento da imagem, é necessário posicionar a câmera mais próxima à arena, se comparada a uma com sistema de zoom, o que implica em erro de perspectiva (Gonzales e Woods, 1992), que se refere à transformação da informação visual real, de três dimensões, para uma imagem plana, de duas dimensões.

A WEBCAM empregada pode adquirir imagens em uma taxa máxima de 30 fps, que é aparentemente suficiente para registrar os movimentos do animal de forma nítida. Por exemplo, um ciclo de ingestão de alimentos em pombos (lançar a cabeça ao alimento e retornar a posição inicial) é de 160 milissegundos (Gennip e Berkhoudt, 1994). Pelo teorema de Nyquist (Ifeachor e Jervis, 1993), é necessário uma frequência de aquisição maior que o dobro da frequência do comportamento, logo, maior que 12,5 fps (quadros por segundos) ou 12,5 hz, para o exemplo.

Para gerar e compactar o arquivo de vídeo com essa mesma taxa, contudo, pode haver uma limitação na capacidade computacional disponível. Os arquivos tipo AVI possuem um padrão de velocidade de 30 fps. No entanto, caso um novo quadro não seja adquirido e compactado a tempo de ser incluído nos arquivos, o algoritmo repete o último quadro processado e a taxa real de aquisição pode ser alterada. Um microcomputador Pentium-III 800Mhz, usado durante o trabalho, grava arquivos de vídeo em formato AVI, sem compactação, a uma taxa real de 13

fps. Por isso, os vídeos tiveram de ser gerados sem compactação. Além disso com um algoritmo de compactação Indeo, 5.0.4 (Ligos, San Francisco, USA), a taxa real é de 6 fps, inferior a taxa necessária de 12,5 fps. Esta situação exigiu que os filmes fossem gravados sem compactação e a etapa de processamento fosse feita em regime *off-line*, para que o computador tivesse todo o seu potencial disponível para gerar o vídeo com uma taxa de aquisição adequada.

Outro problema na aquisição de imagens é o contraste entre a cor do animal e a cor do piso da arena de experimento, que é o principal fator de influência para a qualidade de processamento dos vídeos. Assim o sistema proposto contém etapas que ajudem a imbuir, no pesquisador, a noção do fator de contraste necessário ao funcionamento do sistema (ver comentários nos itens 4.4 e 5.1).

4.3 Preparação dos dados para processamento

Esta etapa prepara o filme digital para ser processado pela etapa de segmentação. É executado a partir do arquivo de vídeo, formado por uma sequência de quadros ou imagens. Em um primeiro momento, o arquivo de vídeo é fragmentado e extrai um quadro individual. Os quadros obtidos são imagens tipo Bitmap (mapa de bits), com padrão de cor RGB e 24 bits de resolução (Klette e Zamperoni, 1996). A cor dos pixels é resultado da combinação de intensidade de 3 cores (vermelho, verde e azul), com 8 bits de resolução (256 variações de intensidade) cada.

Vale lembrar que uma preocupação comum entre os sistemas de rastreamento é a velocidade de processamento de seus algoritmos (Fieguth e Terzopoulos, 1997). Na presente proposta foi estabelecido que os filmes seriam monocromáticos, o que significa que suas imagens possuem apenas uma cor, e resolução de 8 bits (256 níveis de intensidade). Desta forma a necessidade de processamento fica reduzida em um terço do processamento da imagem colorida.

Ainda devido à necessidade de velocidade, optou-se por não normalizar o valor de cor das imagens, procedimento comum em processamento de imagens, onde se transforma a escala de 0 a 255 (256 tons de cinza), em escala de 0 a 1. Esta normalização de cada valor de pixel, apesar de simples, tomaria um tempo de processamento que poderia ser usado para outras operações. Por exemplo, para uma imagem de 320x240 pixels de resolução, seriam necessárias 76800 operações de normalização. Durante o desenvolvimento do algoritmo da etapa de pré-processamento, notou-se uma melhora em torno de 25% na velocidade de processamento quando foi eliminada a operação de normalização.

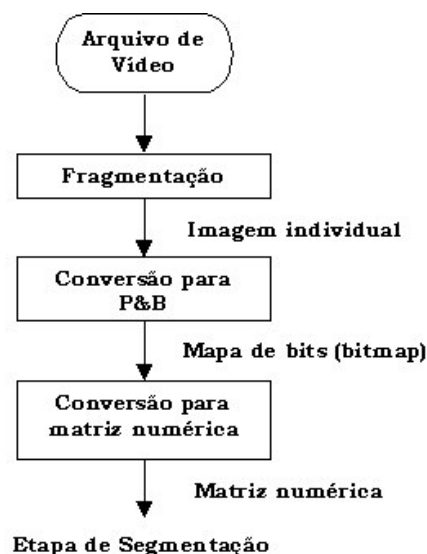


Figura 4 – Fluxograma que representa o processo de preparação

Em um segundo momento, após a fragmentação do vídeo, é obtida uma matriz numérica de mesma dimensão da imagem fragmentada e com os valores referentes à informação monocromática da imagem. Esta é a informação da imagem que será segmentada. O fluxograma que representa o processo desta etapa é visto na Figura 4.

4.4 Segmentação

A etapa de segmentação indica ao sistema quais são as áreas de interesse (objetos) na imagem em processamento. Para tanto, é condição fundamental que existam diferenças de textura (atributos da cor e sua distribuição) entre os objetos de interesse e demais objetos da imagem. Por exemplo, não é possível segmentar um objeto branco inserido em uma cena branca.

O sistema proposto deve executar a segmentação de dois objetos de interesse: o corpo do animal e uma parte escolhida no corpo. O corpo de um animal apresenta uma variação abrupta entre sua cor e a do piso da arena (contraste de cores). Já as diferenças entre a cor de uma parte do corpo do animal e a do resto do corpo, são bastante variáveis e imprevisíveis, pois pode haver muita variação de textura em um único animal. A maioria dos animais utilizados durante o trabalho apresentava um predomínio de transições suaves de cor entre a parte do corpo escolhida (a cabeça) e o restante do corpo. Estas diferentes características dos objetos impuseram o emprego de métodos distintos de segmentação para o corpo e para uma parte escolhida do corpo.

A) SEGMENTAÇÃO DO CORPO DO ANIMAL

O corpo do animal pode ser considerado como um objeto inserido em uma imagem de fundo estática, sem interesse para o sistema e cuja cor apresenta contraste com a cor do animal. A imagem de fundo é a cena da arena de teste onde o animal é filmado e cujo ambiente pode ser alterado ao arbítrio do pesquisador.

Estas condições são adequadas para o uso do método de segmentação por subtração do plano de fundo (ou “background subtraction”: McKenna et al., 2000; Quen-Zong e Bor-Shenn, 2002; Intel, 1999). É um método simples e de fácil

implementação, porém que requer uma câmera fixa e uma cena de fundo estática, exigências cumpridas pelas condições dos experimentos.

O método de subtração do plano de fundo segmenta o objeto de interesse a partir de uma imagem em processamento $f(x,y)$, que contém o objeto, e uma imagem do fundo da cena $p(x,y)$, estática, e sem a presença do objeto (vazia). Separadamente, cada pixel da imagem é subtraído do pixel da cena vazia de mesma posição, e sobre este resultado é aplicada uma limiarização ou “threshold” (Gonzales e Woods, 1992; Klette e Zamperoni, 1996). Ou seja, se a diferença entre os dois pixels é maior que um valor de limiar global Lg , isto indica que o pixel da imagem em processamento pertence ao objeto de interesse, como é visto na Eq.1. A aplicação do método resulta em uma imagem $g(x,y)$, composta pelos pixels pertencentes ao objeto de interesse, e é preenchida por pixels de uma cor pc escolhida para compor o fundo da imagem.

$$\begin{aligned} g(x,y) &= f(x,y) & \text{Se } \text{abs}[p(x,y) - f(x,y)] > Lg \\ \text{e } g(x,y) &= pc & \text{Se } \text{abs}[p(x,y) - f(x,y)] \leq Lg \end{aligned} \quad (1)$$

A primeira dificuldade no uso deste método é a sua dependência em relação à variância espacial da cena de fundo das imagens. Isto porque a maneira mais usual de obter a cena vazia é a forma estatística. Os valores dos pixels da cena estática de fundo variam pouco ao longo das imagens. É adotado que tal variação tem uma distribuição normal entre os quadros sucessivos do registro. Assim, o método identifica os pixels que fazem parte do animal como aqueles cujo valor entre ele e o valor médio da normal é maior que o desvio padrão. A curva normal é estimada para cada pixel da imagem, a partir de uma sequência de N quadros anteriores ao quadro em processamento, na qual $m_{(x,y)}$ e $\sigma(x,y)$ são média e

desvio padrão de cada coordenada nos N quadros considerados, calculados pelas Eq.2 e Eq.3 respectivamente . Comparado com a Eq.1 a imagem de fundo da cena $p(x,y)$ é substituída pela média $m(x,y)$ e o limiar global Lg é substituído pelo desvio padrão $\sigma(x,y)$, que resulta na Eq.4, onde C é uma constante que diminui a seletividade da equação ($3.\sigma$ seleciona valores de pixels em quase a totalidade da curva normal envolvida).

$$m(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N \tilde{f}i(x, y) \quad (2)$$

$$\sigma(x, y) = \sqrt{\sum_{i=0}^N \tilde{f}i^2(x, y) - m(x, y)^2} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} g(x,y) &= f(x,y) & \text{Se } \text{abs}[m(x,y) - f(x,y)] > C \cdot \sigma(x, y) \\ e \quad g(x,y) &= pc & \text{Se } \text{abs}[m(x,y) - f(x,y)] \leq C \cdot \sigma(x, y) \end{aligned} \quad (4)$$

A estimação da cena de fundo deve ser calculada para cada novo quadro em processamento. O corpo não será segmentado caso ele permaneça parado durante os N quadros (por exemplo, quando o animal está dormindo), pois os pixels do animal foram considerados no cálculo da cena de fundo e passam a fazer parte dela. Isto exige que sejam considerados alguns segundos ou minutos do vídeo para estimar uma cena (ou seja, um grande número de quadros e um grande tempo computacional).

Para este trabalho, levando em consideração que as condições dos experimentos podem ser manipuladas, optou-se por adquirir a imagem da cena vazia diretamente do experimento ao invés de obtê-la por cálculo, como visto. A cena é obtida utilizando a mesma WEBCAM usada para a filmagem, fixada sobre a

cena. Com o ambiente de experimento pronto para a sessão de teste, é feita uma foto digital e logo em seguida, o animal é introduzido na arena para o início da filmagem do experimento. Desta forma a imagem de cena vazia adquirida não contém o animal (objeto de interesse) mas é fiel à cena de fundo do filme. Os pixels do objeto não serão considerados como parte da cena pois não há necessidade de estimar a cena pelo cálculo da normal. A Figura 5 mostra um exemplo de resultado de limiarização, após a subtração com uma foto da cena de fundo e a imagem em processamento.

Uma segunda dificuldade no uso do método por subtração de plano de fundo é a determinação de um valor de limiarização global ótimo quando as regiões da imagem possuem desvio-padrões diferentes. No entanto, a dificuldade é eliminada com o uso de uma foto da cena de fundo vazia.



Figura 5 – Exemplo de aplicação do método por subtração de plano de fundo

Foi observado que o contraste entre a cor de piso da arena e a cor do animal é um fator decisivo para a segmentação do objeto, em qualquer ponto da arena. Em função disso, foi definido que o patamar de limiarização a ser utilizado no processamento deve ser escolhido pelo pesquisador, para ajudar a despertar-lhe a necessidade de impor contraste (entre a cor do animal e a cor do piso) necessário a uma segmentação adequada.

Na Figura 6 são mostrados exemplos de variação do patamar de limiarização e os resultados na segmentação. Como os valores de cor variam de 0 a 255, foram utilizados esses níveis para indicar a diferença de valor entre os pixels. Na Figura 6 a) são considerados pixels do objeto, aqueles cuja diferença entre as imagens é maior ou igual a 0, ou seja, todos os pixels; em b) são considerados pixels do objeto, aqueles cuja diferença entre as imagens é maior que 25; etc. Da

mesma forma, g) apresenta poucos pixels, pois são apenas aqueles cuja diferença entre o pixel da imagem e da cena de fundo é maior que 175 níveis de cinza, ou seja, os que apresentaram um grande contraste. É esta noção de contraste que o pesquisador deve desenvolver para garantir o processamento adequado do vídeo.

Uma sugestão de valor inicial para segmentação é o valor de diferença entre as cores de fundo e do animal. Sua obtenção é abordado no capítulo 51 e pode ser feita através do software desenvolvido.

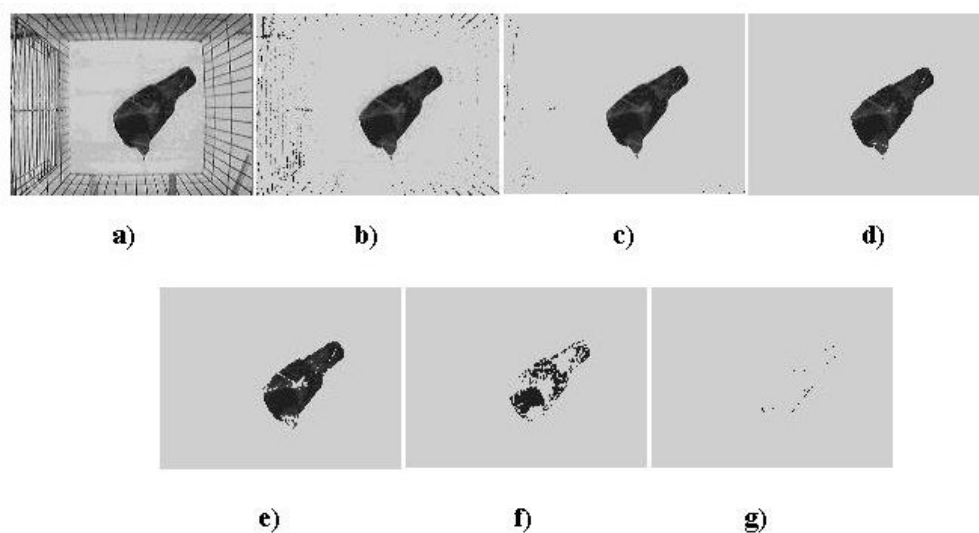


Figura 6 – Apresentação de 5 diferentes valores de limiarização. a) Limiar igual a 0; b) Limiar igual a 25; c) Limiar igual a 50; d) Limiar igual a 100; e) Limiar igual a 125; f) Limiar igual a 150; g) Limiar igual a 175.

Durante o uso do método, foi observado que variações na intensidade da luz no ambiente de teste devido às falhas de alimentação, ao longo da filmagem de um experimento, resultam em ineficiência no momento da segmentação do animal.

O fato mostra uma deficiência do método, pois não considera alterações na cena de fundo ao longo da filmagem. A forma encontrada para reverter o problema foi a inclusão de um fator de diferença de intensidade luminosa entre as duas imagens (de fundo e aquela em processamento), no resultado da subtração, visto na Eq.5. O fator é determinado pelo cálculo da média das diferenças md entre 50

amostras de pixels de mesma posição, visto na Eq.6 , tomadas nas periferias das imagens linha. Este recurso eliminou a influência da variação da iluminação na segmentação do objeto, ao longo do filme.

$$\begin{aligned} g(x,y) &= f(x,y) & \text{Se } abs[p(x,y) - f(x,y) + md] > Lg \\ e \quad g(x,y) &= pc & \text{Se } abs[p(x,y) - f(x,y) + md] \leq Lg \end{aligned} \quad (5)$$

$$md = \frac{1}{50} \sum_{i=0}^{49} f(i,5) \quad (6)$$

Até este momento do processo, já são conhecidos os pixels da imagem que pertencem ao corpo do animal. A seguir serão determinados os pixels que pertencem a uma parte escolhida de seu corpo.

B) SEGMENTAÇÃO DE UMA PARTE DO CORPO DO ANIMAL

Em um primeiro instante do desenvolvimento do sistema, a segmentação foi voltada exclusivamente para a cabeça do pombo. A definição do formato da cabeça e das suas diferenças para com o formato do corpo sugere o uso de métodos de segmentação com operadores morfológicos (Gonzales e Woods, 1992; Klette e Zamperoni, 1996; Marques Filho e Vieira Neto, 1999) aplicados juntamente com funções de extração de borda da imagem do animal. Porém a aplicação deste método foi descartada tão logo se percebeu que as imagens adquiridas nos experimentos não apresentavam as formas da cabeça dos animais suficientemente definidas para segmentação.

O contato com os métodos descritos a seguir expandiu a expectativa de rastreamento da cabeça para qualquer parte do corpo do animal. A segmentação de parte do corpo do animal foi definida como um processo semi-automático. A parte

do animal que a ser rastreada é escolhida antes se de iniciar o processamento do vídeo, e isto é feito apenas uma vez para cada arquivo processado.

A escolha é feita pelo desenho de uma janela sobre a imagem do animal. A imagem confinada aos limites desta janela de área A_p , de dimensão $I \times J$, é tomada como a referência da parte do animal escolhida para a segmentação. Esta imagem será denominada *imagem padrão* (ver Figura 1).

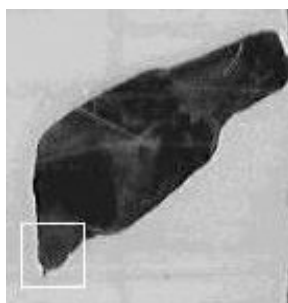


Figura 7 – Exemplo de *imagem padrão* definida sobre a cabeça do animal

A maioria dos animais utilizados, durante o trabalho, apresentava um predomínio de transições suaves de cor entre os dois objetos (no caso, entre a cabeça e o corpo). Esta característica limitou o universo de métodos de segmentação utilizáveis, pois boa parte deles depende do contraste entre o objeto de interesse e o fundo onde está inserido, como os métodos por subtração por plano de fundo (McKenna et al., 2000), por snakes (Won et al., 2001; Ji e Yan, 2002), e por detecção de movimento (Jong-Bae e Hang-Joon, 2003). O grupo de métodos que mostrou maior afinidade com o problema foi o relativo a métodos que extraem características da imagem padrão para localizar as áreas de mesma afinidade na imagem em processamento. Tais procedimentos incluem os métodos por estatística (Fieguth e Terzopoulos, 1997; Illmann et al., 2002), por correlação (Lew et al., 2000; Nickels e Hutchinson, 2002) e por redes neurais (Tabb et al., 2002).

O método estatístico mostrou-se interessante devido à sua simplicidade de implementação e velocidade de processamento, quando comparado aos demais métodos. Basicamente, é extraída uma característica estatística, por exemplo a média dos valores dos pixels, das áreas A_p pertencentes à imagem em processamento. A posição da parte escolhida será considerada a coordenada do centro da área cuja média mais se assemelha ao valor de média extraída da *imagem padrão* escolhida. Esta operação pode ser visualizada como uma máscara de área A_p , de dimensão IJ , que é deslocada por todas as coordenadas da imagem em processamento. Para cada coordenada deslocada, é realizado o cálculo da média, feito sobre o conjunto de pixels que pertencem à máscara, como apresentado na Figura 8, e o seu resultado é atribuído à coordenada central da máscara. Essa análise é repetida para com todos os quadros do vídeo, e identifica a posição da parte escolhida em cada um.

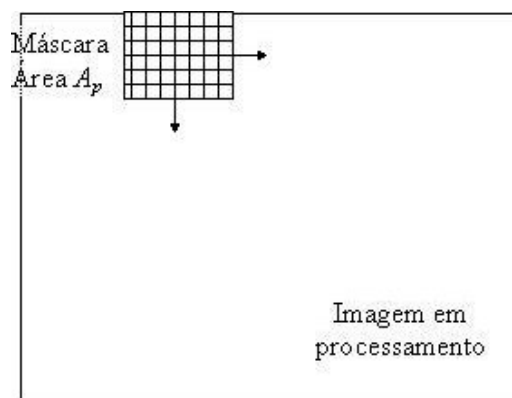


Figura 8 - Processo de mapeamento estatístico usado no rastreamento de uma parte escolhida do animal.

O método foi testado com o uso de variância e posteriormente com desvio padrão, como características estatísticas, mas em ambos os casos o método apresentou uma localização correta da parte escolhida. Foram encontradas muitas outras áreas na imagem com valores próximos ou idênticos aos valores calculados

com a *imagem padrão*, o que não possibilitou determinar a posição da cabeça (parte escolhida). Por exemplo, a Figura 9-c apresenta um levantamento de semelhança entre uma *imagem padrão* limitada por um quadrado sobre a cabeça do animal, e toda a imagem do animal. Pode-se notar que o método identifica maiores valores de semelhança nas áreas da imagem que contém o animal do que naquelas que contém o fundo da imagem. Porém o método não foi capaz de evidenciar nitidamente no corpo os pontos de maior semelhança com a *imagem padrão*. Muitas áreas apresentaram os mesmos valores das variáveis estatísticas calculadas sobre *imagem padrão* (ver Figura 9- b).

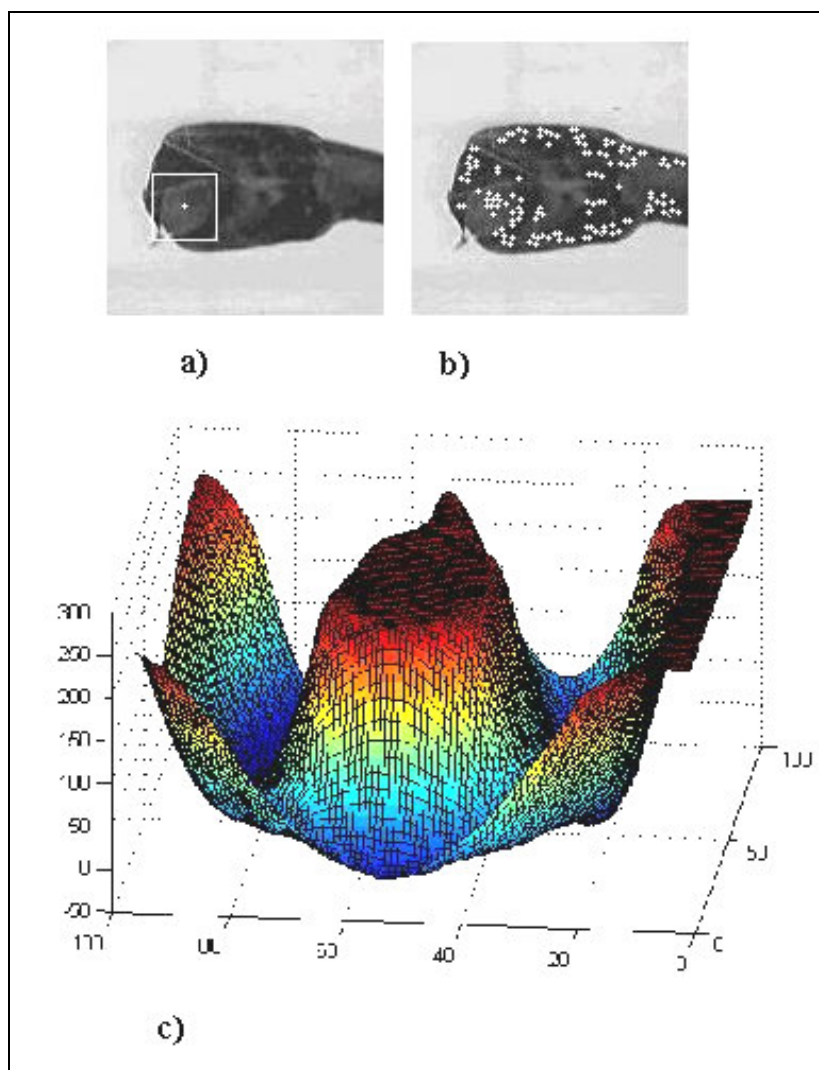


Figura 9 - Procura por áreas semelhantes através de método estatístico. a) Área pré-escolhida de 32x32 pixels sobre a cabeça do animal; b) Alguns pontos que apresentam mesmos valores de variância da área pré-escolhida. c) O mapeamento tridimensional das áreas de maior semelhança com a cabeça, através do método estatístico. A maior semelhança com a *imagem padrão* é 255 e a menor é 0.

Ao longo do trabalho, foram testados vários tamanhos de máscara. Além disso, testou-se a inclusão da média como característica estatística, na análise de semelhança, visando aumentar a eficiência do rastreamento. Em nenhum destes testes o método se apresentou satisfatório, isto é, o método estatístico não

apresenta capacidade de identificar a parte escolhida, nas condições necessárias a este trabalho.

O método estatístico pode ser aplicado em objetos que apresentam poucas semelhanças entre uma área escolhida e o resto da imagem (Fieguth e Terzopoulos, 1997). O número de informações que caracterizam uma área pode ainda ser aumentado através do cálculo da característica estatística em algumas sub-áreas da *imagem padrão*, que deve ter tamanho suficientemente grande para comportar subdivisões, as quais diferem das condições de aplicação deste trabalho, onde a área escolhida sobre o animal normalmente é pequena (os animais são pequenos e suas partes também). Além disso, o método estatístico usado por Fieguth e Terzopoulos, 1997, aplicado no rastreamento de partes de uma pessoa, não considera que a parte escolhida possa alterar sua textura e forma ao longo do rastreamento. Diferente de aplicações com o rastreamento real de animais, onde as condições de alteração da textura e da forma são certas e imprevisíveis (os animais nos experimentos são livres para se movimentar). Assim, para esta aplicação, o uso do método estatístico foi descartado.

O método de segmentação por correlação (Nickels e Hutchinson, 1999; Olson, 2000; Lew et al., 2000; Nickels e Hutchinson, 2002) mantém o formato do método estatístico de mapear uma característica da imagem através de uma máscara que se desloca por todas as coordenadas. Porém, neste método o grau de semelhança entre as duas imagens é determinado pelo cálculo de correlação entre elas (Ifeachor e Jervis, 1993). Como no método estatístico, a nova posição da parte escolhida será a coordenada da imagem processada com a maior semelhança com *imagem padrão*.

O cálculo de correlação pode ser feito de duas formas, uma por correlação baseada em *SSD* (sum of the squared difference) vista na Eq.7, que indica uma semelhança entre as áreas, por um fator de diferença dado pelo somatório do quadrado da diferença entre os valores dos pixels de mesma posição da *imagem padrão* e da imagem sob a máscara; a outra forma é a correlação baseada em *SAD* (sum of the absolute differences), visto na Eq.8, que difere da primeira por calcular o somatório da diferença absoluta entre os valores dos pixels de mesma posição, da *imagem padrão* e da imagem em processamento sob a máscara. Em ambas as formas (*SAD* e *SSD*), o fator calculado é igual zero quando uma área da imagem é idêntica à da *imagem padrão*. Em ambos os casos, $f(x,y)$ é a imagem em processamento e $p(i,j)$ é a *imagem padrão*, para uma imagem de dimensão XY e *imagem padrão* de dimensão IJ .

$$SSD(x, y) = \sum_{i=0}^{I-1} \sum_{j=0}^{J-1} [p(i, j) - f(x+i, y+j)]^2 \quad (7)$$

$$SAD(x, y) = \sum_{i=0}^{I-1} \sum_{j=0}^{J-1} abs[p(i, j) - f(x+i, y+j)] \quad (8)$$

Não foram notadas diferenças significativas entre os resultados obtidos com ambas as formas de correlação. Porém, foi adotada a correlação *SSD* por exigir uma operação mais simplificada que a correlação *SAD*.

Observando-se que, durante a movimentação de um animal, a parte escolhida aparece freqüentemente rotacionada em seu eixo lateral e/ou em seu eixo longitudinal, se comparada com a direção inicial da *imagem padrão* (como é mostrado na Figura 10).

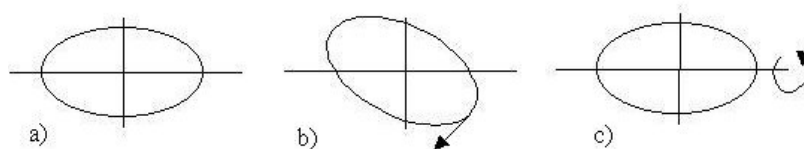


Figura 10 - Possibilidades de rotação do objeto de interesse. a) Sem rotação; b) Rotação lateral; c) Rotação longitudinal

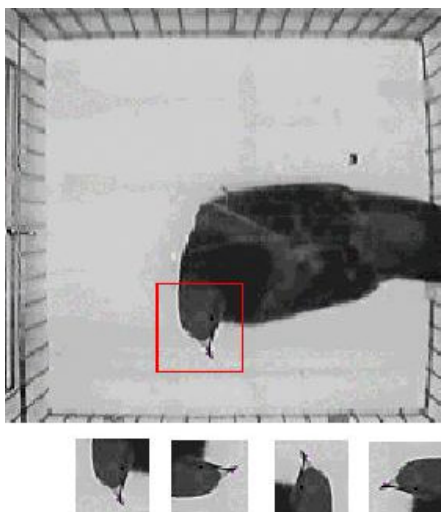


Figura 11 - Exemplo de banco de imagens com quatro rotações.

Devido a isso, concomitante à escolha do cálculo por *SSD*, também foi adotado o uso de um banco de imagens para simular uma parcela das rotações que a parte escolhida pode executar. O banco é formado por imagens a partir da *imagem padrão* escolhida, que são rotacionada em 5 graus umas das outras, até obter um giro completo da imagem. Com esta melhoria, a busca pela posição da parte escolhida na imagem em processamento agora é feita para com o ponto de maior semelhança com todas as imagens do banco de *imagens padrão*. A Figura 11 mostra um exemplo de formação do banco de *imagem padrão*, com quatro rotações de 90° cada. A rotação longitudinal somente pode ser simulada em sistemas que trabalham com 3 dimensões, não sendo o caso do sistema aqui desenvolvido.

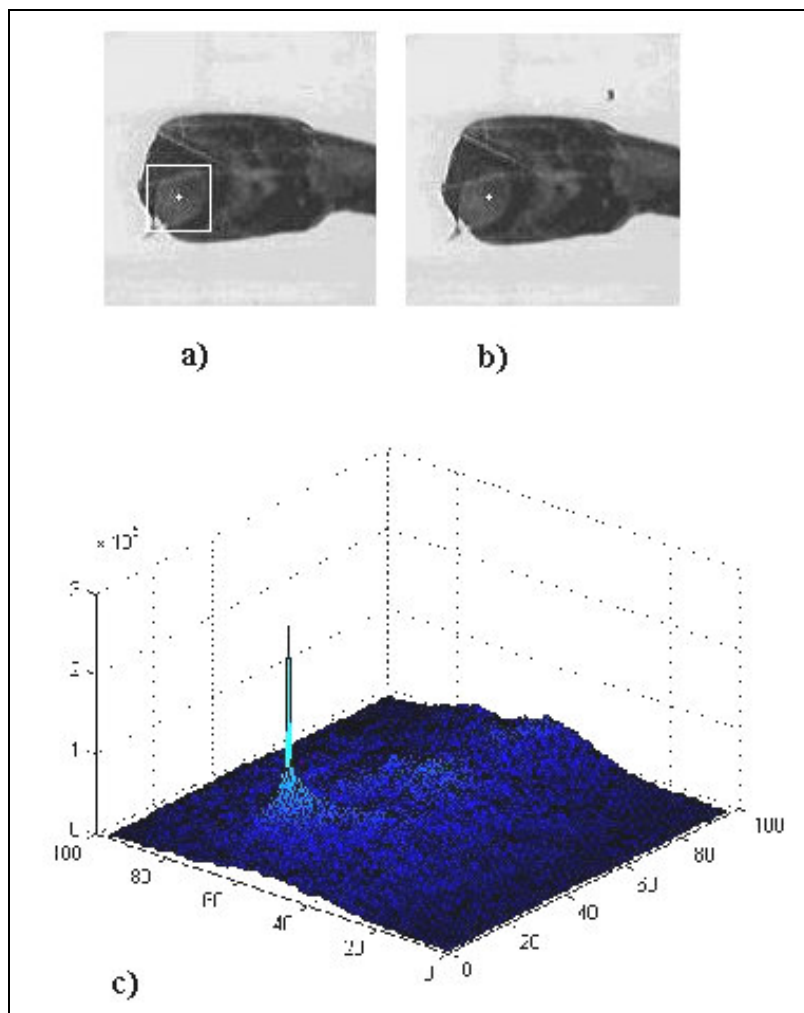


Figura 12 - Procura por áreas semelhantes através de método por correlação. a) Área escolhida de 32x32 pixels sobre a cabeça do animal como *imagem padrão*; b) Ponto marcado que apresenta maior semelhanças com área escolhida; c) Distribuição de semelhança entre a área escolhida e todo o corpo do animal

A Figura 12-c apresenta um levantamento de semelhança, o mesmo feito no método estatístico (ver Figura 9), entre uma *imagem padrão* limitada por um quadrado sobre a cabeça do animal e toda a imagem do animal. Verifica-se que o método por correlação identificou uma única área da imagem que possui semelhança com a cabeça do animal, a área exata ponto central da *imagem padrão*

demarcada. O que demonstram que o método por correlação indica a semelhança entre as áreas com mais precisão que o método estatístico.

No entanto, o tempo de processamento tornou-se um fator preocupante com o emprego deste método, que passou a usar alguns minutos para processar uma única imagem, dificultando a verificação de sua efetividade ao longo de um registro prolongado, o que levaria dias de processamento para um filme de alguns minutos. Para aumentar a velocidade de processamento, opto-se por não normalizar os dados das imagens (comentado no item *Pré-processamento*). Também foi reduzido o número de imagens no banco de imagens padrão, que passaram a ser rotacionadas por um ângulo escolhido pelo pesquisador, otimizando a velocidade de processamento. Por exemplo, a aplicação de um ângulo de 30 graus reduz o banco inicial (com 72 imagens, uma imagem a cada 5 graus) para um banco com 12 imagens (uma imagem a cada 30 graus). No mesmo sentido, o cálculo de semelhança por correlação passou a ter sua unidade de incremento do somatório escolhida pelo pesquisador. Isto reduziu o número de elementos considerados no cálculo da semelhança, bem como seu tempo de processamento. Por exemplo, no processamento de uma máscara de 20x20 pixels e o incremento normalmente aplicado de 1 pixel no cálculo da correlação da máscara, serão considerados 400 pixels no cálculo de semelhança, enquanto se escolhido um valor de incremento igual a 5, serão levados em consideração 80 pixels, o que contribui para diminuir o tempo de processamento. Ambos os valores de incremento e rotação dos algoritmos que calculam a semelhanças entre as imagens passaram a ser escolhidos pelo pesquisador, que opta por uma relação de compromisso entre a velocidade do processamento e a eficiência da segmentação.

O fluxograma que representa o processo desta etapa é visto na Figura 13.

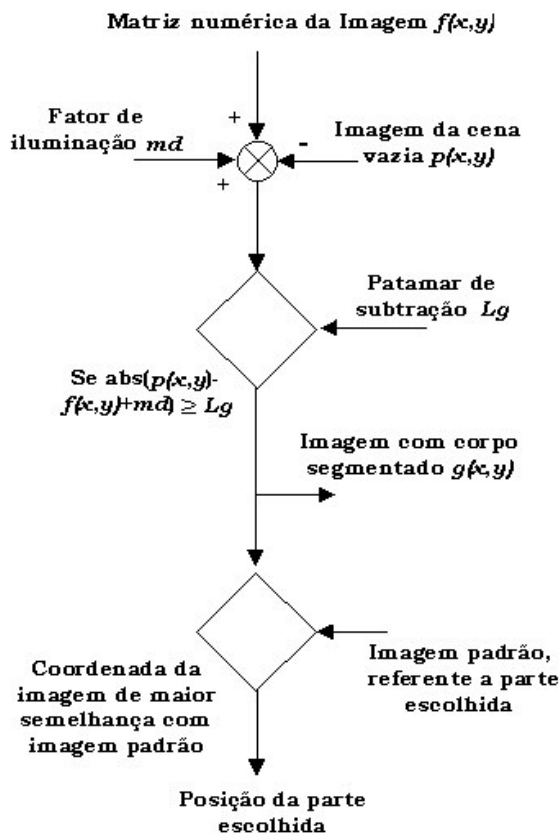


Figura 13 - Fluxograma que representa o processamento

Uma implementação significativa foi à limitação dos pontos na imagem em processamento, nos quais o método verifica a semelhança com a imagem padrão. O cálculo de semelhança foi limitado a uma zona em torno da última posição conhecida da parte escolhida. Esta estratégia aumentou a velocidade de processamento e também a eficiência de busca do ponto mais semelhante à *imagem padrão*. Após estas alterações, o tempo de processamento reduziu para algumas dezenas de milisegundos por imagem processada, que foi considerado aceitável e viabilizou o uso do sistema em situação experimental real. No entanto, verificou-se que ao longo de filmes cujos animais apresentavam poucas diferenças de textura no corpo a parte escolhida era rastreada corretamente nos primeiros quadros, mas logo depois o sistema passava a rastrear uma parte que não era a escolhida, e

assim permanecia ao longo do filme. Por vezes, enquanto um animal se movimenta desloca a parte escolhida para próximo de outras partes corpo com mesmos fatores de semelhança da primeira. O sistema identifica erroneamente uma dessas outras áreas como sendo a parte escolhida e permanece rastreando-a, enquanto a parte de interesse real continua seu deslocamento sem ser rastreada.

Por exemplo, a

Figura 14 ilustra uma condição de rastreamento que ocorre ao longo do registro. Quando uma *imagem padrão* escolhida em um quadro inicial, com o animal em uma posição, e é correlacionada com uma imagem em outro ponto do filme. A *imagem padrão* limitada pelo quadrado sobre a cabeça do animal, vista em c), é correlacionada com toda a imagem do animal (em outro momento do registro), vista em d). O resultado da distribuição de semelhança é visto em a) e b), onde o círculo indica a área de maior semelhança com a cabeça. Porém, é possível notar em a) que outros pontos foram considerados semelhantes à *imagem padrão*. Um eventual deslocamento da parte escolhida que passe próximo a estas áreas de semelhança pode acarretar na identificação errada da *imagem padrão*. Por consequência, o sistema continua rastreando uma parte do animal ao longo do registro, que não é a parte inicialmente escolhida, e a gerar dados falsos sobre a posição da mesma.

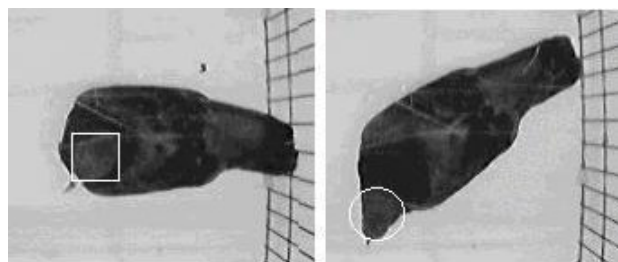
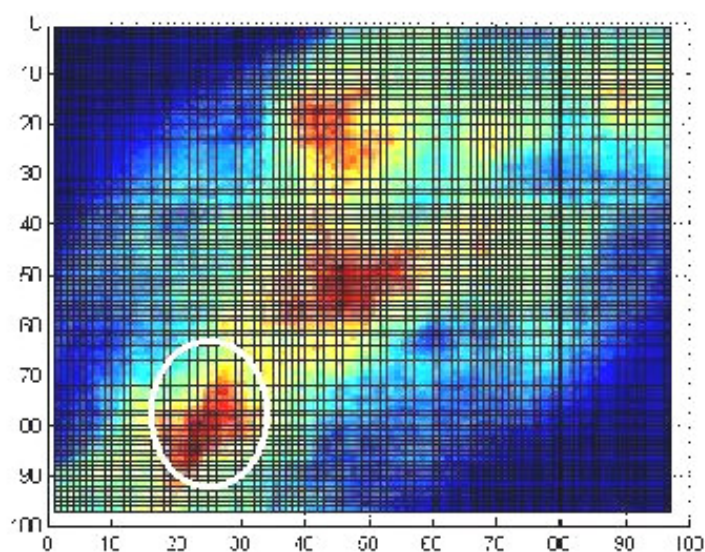
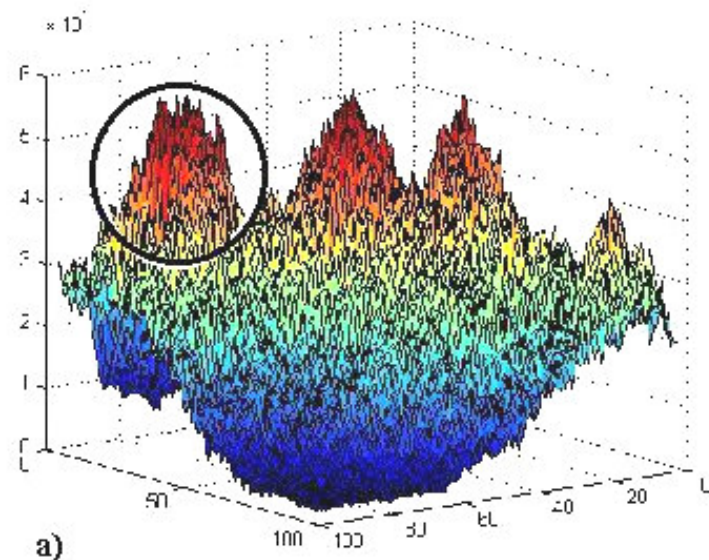


Figura 14 – a) e b) Formas tridimensional e bidimensional da distribuição da semelhança entre a imagem da cabeça do animal e sua correlação com o animal; c) *Imagem padrão* limitada pelo quadrado, em um quadro do filme; d) Quadro em outro ponto do filme, no qual foi realizado o mapeamento da correlação com a *imagem padrão*, visto a) e b) .

4.5 Extração de características

Uma vez identificados os objetos de interesse na imagem e conhecidos os pixels pertencentes a cada objeto, o processamento entra na etapa de extração de características. Esta etapa tem a função de extrair informações dos objetos selecionados diretamente sobre a figura em processamento. São 6 as características extraídas:

A) POSIÇÃO DO ANIMAL

A posição do animal é uma informação de relevância para um sistema de rastreamento. De posse desta é possível representar a trajetória pela qual o animal se deslocou durante o experimento.

$$Se \ f(x, y) \in s(x, y) \rightarrow \begin{cases} C_x = \frac{\sum x}{Tp} \\ C_y = \frac{\sum y}{Tp} \end{cases} \quad e \quad (9)$$

A posição do animal é obtida a partir de uma adaptação do método de cálculo de centro de massa por distribuição probabilística 2D (Intel, 1999), onde a posição é obtida pela média do valor das coordenadas dos pixels que pertencem ao corpo do animal, como é visto na Eq.9, onde Tp é o número de pixels da imagem pertencentes ao animal. No término do processo, é obtido um valor para as coordenadas (x,y) que representa a posição do corpo do animal no plano da imagem em processamento, denominadas: C_x e C_y .

No entanto, deve ser observado que o cálculo é feito sobre uma imagem em duas dimensões, o que resulta em centro de área e não em centro de massa (que na física sintetiza a posição do corpo). Este fato pode ser um problema em aplicações

onde há maior concentração de massa do que de área. Por exemplo, ratos concentram a maior parte do seu peso na cabeça, no tronco e nas pernas. Porém, a cauda possui área considerável, se comparada ao resto do corpo, o que leva a erro no resultado da posição. Assim, a precisão dos resultados dependendo das características ponderais do animal em teste.

B) POSIÇÃO DA PARTE PRÉ-ESCOLHIDA DO ANIMAL

A posição da parte escolhida do animal é obtida durante o processo de segmentação da mesma. A posição é o ponto da imagem em processamento, cuja área apresentou a maior semelhança com a *imagem padrão*. Da mesma forma, com esta informação é possível representar a trajetória pela qual a parte do animal se deslocou durante o experimento.

C) DIREÇÃO DO ANIMAL:

A direção do animal é um valor em graus que indica uma tendência de alinhamento dos pixels do corpo do animal. Com esta informação obtém-se o deslocamento rotacional ao longo do experimento, que será visto no item Pós-processamento.

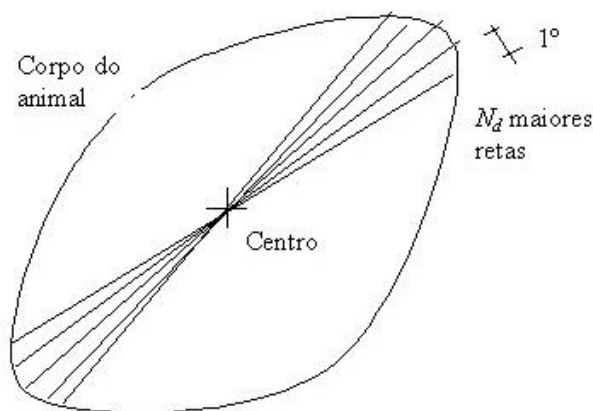


Figura 15 - O ângulo geral do corpo é dado pela média dos ângulos das N_d maiores retas geradas, que atravessam o corpo do animal e por 180° em intervalos de 1°.

Apesar de existir um método probabilístico para o cálculo da direção de massa, a forma implementada apresentou um processamento mais rápido. No sistema aqui apresentado, a direção do animal é obtida pela medição do tamanho de retas que atravessam o objeto, através do seu centro (ver Figura 15). O valor da direção é resultado da média dos ângulos das N_d maiores retas encontradas, onde N_d é uma variável que também pode ser alterado pelo pesquisador.

D) COMPRIMENTO DO ANIMAL

O comprimento do animal é o obtido pela média de tamanho das N_d retas usadas para o cálculo da direção do animal, no item anterior.

E) TAMANHO DO ANIMAL (ÁREA DO ANIMAL)

O tamanho do animal Tp é resulta número de pixels que pertencem ao objeto, obtido durante o processo de segmentação. No processo de limiarização, uma variável que representa o tamanho do animal é incrementada sempre que o sistema infere que um pixel pertence ao objeto, e no término do processo é obtida a totalização dos pixels que pertencem ao animal.

F) NÚMERO DE PIXELS ALTERADOS ENTRE DOIS QUADROS CONSECUTIVOS:

O número de pixels alterados entre dois quadros consecutivos é obtido pela limiarização do resultado da subtração entre os pixels de dois quadros subseqüentes do vídeo. Uma variável de totalização é acrescida de uma unidade para cada resultado superior ao limiar escolhido. Esta medida ganhou importância nos últimos anos, pois em muitos casos pode indicar o nível da atividade animal.

4.6 Pós-processamento

Esta é a última etapa operacional do sistema proposto. Tem a função de obter outras informações, além daquelas mencionadas no item 4.5, de acordo com as necessidades do pesquisador.

Ela não faz parte do processamento de imagem, e os cálculos são executados a partir de uma matriz com todas as características extraídas do vídeo na etapa de extração de características. Além disso, conta com outros dados fornecidos pelos pesquisadores, tais como as localizações e o número de áreas de interesse da imagem, tamanho real da arena e os valores de limiarização do deslocamento para a classificação dos movimentos. As onze características calculadas nesta etapa são:

A) TOTAL DE DESLOCAMENTO DO CORPO

Para cada nova característica “posição do corpo” extraída, é calculada a distância entre a nova posição e a posição anterior. Uma variável é incrementada com o valor calculado, a qual totaliza o deslocamento do corpo ao longo do experimento.

B) VELOCIDADE MÉDIA DO CORPO

É calculada a velocidade média do corpo ao longo de experimento, a partir do deslocamento total do corpo e do tempo de vídeo.

C) TEMPO TOTAL DE PERMANÊNCIA DO CORPO NA ÁREA DE INTERESSE

Para cada quadro processado, é verificado se o corpo está dentro da área de interesse na arena. Se for verdadeiro, uma variável é incrementada com o tempo de

exposição de um quadro (33 milissegundos), e totaliza o tempo de permanência do animal na área de interesse, ao longo do experimento.

D) NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS DO CORPO NA ÁREA DE INTERESSE

Para cada quadro processado, é verificado se o corpo está dentro da área de interesse na arena. Se a informação mudar de falsa para verdadeira, uma variável é incrementada em uma unidade, e totaliza o número de entradas do animal na área de interesse, ao longo do experimento.

E) NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS DA PARTE ESCOLHIDA DO ANIMAL, NA ÁREA DE INTERESSE

Para cada quadro processado, é verificado se a parte escolhida está dentro da área de interesse na arena. Se a informação mudar de falsa para verdadeira, uma variável é incrementada em uma unidade, e totaliza o número de entradas da parte escolhida na área de interesse, ao longo do experimento.

F) DESLOCAMENTO TOTAL DA PARTE ESCOLHIDA

Para cada nova característica “posição da parte escolhida” extraída, é calculada a distância entre a nova posição e a posição anterior. Uma variável é incrementada com o valor calculado, a qual totaliza o deslocamento da parte escolhida, ao longo do experimento.

G) SOMATÓRIO DAS DISTÂNCIAS ENTRE CORPO E A PARTE ESCOLHIDA

Para novas características “posição do corpo” e “posição da parte escolhida” extraídas é calculada a distância entre as duas posições. Uma variável é incrementada com o valor calculado, e totaliza a distância entre o corpo e a parte escolhida ao longo do experimento.

H) DESLOCAMENTO TOTAL ANGULAR DO CORPO EM SENTIDO HORÁRIO E DESLOCAMENTO TOTAL ANGULAR DO CORPO EM SENTIDO ANTIHORÁRIO

Para cada nova informação de “direção do animal” extraída no item 4.1.4, é calculado o ângulo de rotação entre a nova direção e a direção anterior. Se a rotação for horária, uma variável é incrementada com o ângulo calculado, e totaliza o deslocamento angular do corpo em sentido horário ao longo do experimento. Se a rotação for anti-horária, uma outra variável é incrementada com o ângulo calculado, e totaliza o deslocamento angular do corpo em sentido anti-horário.

I) CLASSIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO

É feita uma totalização dos deslocamentos do corpo entre as posições extraídas em cada um dos quadros, que se sucedem em uma janela de 30 quadros do vídeo (equivalente a um segundo de vídeo). A janela totaliza o deslocamento do animal entre os 15 quadros anteriores e os 15 quadros posteriores ao quadro em processamento. Esta operação foi necessária, pois o deslocamento entre dois quadros consecutivos é uma medida muito pequena em relação à noção de deslocamento conhecida pelo pesquisador, já que o tempo entre dois quadros é de 30,3 milissegundos. Assim, o janelamento resulta no deslocamento em uma unidade de tempo conhecido pelo qual o pesquisador (um segundo) e, conseqüentemente, classificar o deslocamento. Com o valor da totalização, o comportamento é classificado de acordo com os patamares informados pelo pesquisador, em locomotor, não-locomotor e sem locomoção (imobilidade). Uma variável mantém esta classificação para ser usada por outros processos.

J) NÚMERO TOTAL MUDANÇAS DE COMPORTAMENTO

Para cada alteração no valor da característica “classificação do movimento”, uma variável é incrementada em uma unidade, e totaliza o número de mudança de comportamento ao longo do experimento.

K) NÚMERO TOTAL DE PIXELS ALTERADOS

Para cada nova característica “número de pixels alterados entre dois quadros consecutivos” extraído no item 4.1.4, uma variável é incrementada com o novo valor, e totaliza o número de pixels alterados ao longo do experimento.

Ainda dentro da etapa de pós-processamento é feita uma extração das mesmas características dos itens anteriores, porém com intervalos de tempo escolhido pelo pesquisador. Isto significa poder obter dados parciais do teste, a cada intervalo, ao longo do experimento. Com o término da extração das informações, o sistema gera um arquivo tipo CSV, que contém todos os dados obtidos ao longo do processo, e que é compatível com diversos programas estatísticos (Excel, Statistica), para uso dos dados em outras análises.

5. A FERRAMENTA DE SOFTWARE DESENVOLVIDA

A ferramenta de software foi desenvolvida com o propósito de implementar os métodos e etapas descritas no capítulo anterior. A ferramenta leva em consideração as necessidades requeridas pelo processamento de imagens, além de outras características de ordem prática sugeridas pelos pesquisadores do LNFI, ao longo do trabalho.

O processamento é feito *off-line* a partir do filme digital do experimento (em formato AVI); e de uma foto digital da cena de vazia (em formato BMP), como definido anteriormente.

Para implementar as características exigidas, o software foi dividido em três etapas operacionais: etapa de preparação, etapa de processamento do vídeo e etapa de pós-processamento. A ferramenta foi desenvolvida em CBuilder 5.0 (Borland Software Corporation, Scotts Valley, USA), com concepção de software orientado a objeto, devido a sua interface amigável para com o usuário.

5.1 Etapa de preparação

Esta etapa tem a função de “preparar” o software para as condições necessárias ao uso dos métodos de segmentação escolhidos. As principais funções desta etapa são:

a) A escolha do patamar de limiarização que será usado pelo método de segmentação por subtração do plano de fundo (Figura 16). Uma tela mostra uma segmentação de um quadro escolhido do filme, que contém o animal. Variando o valor de limiar, o pesquisador escolhe aquele que melhor segmenta o animal do resto da imagem. O valor de limiar escolhido será usado pela função de

segmentação, ao longo do processamento de todo o vídeo. Uma sugestão de valor limiar mais próxima daquela que será a adequado à segmentação é obtido pela medição da diferença de cores entre o piso da arena e o animal. Sua obtenção pode ser feita clicando a imagem escolhida inicialmente, primeiro sobre área referente ao fundo e em seguida sobre o animal, em seguida uma janela mostra o valor de diferença entre as cores das áreas escolhidas.

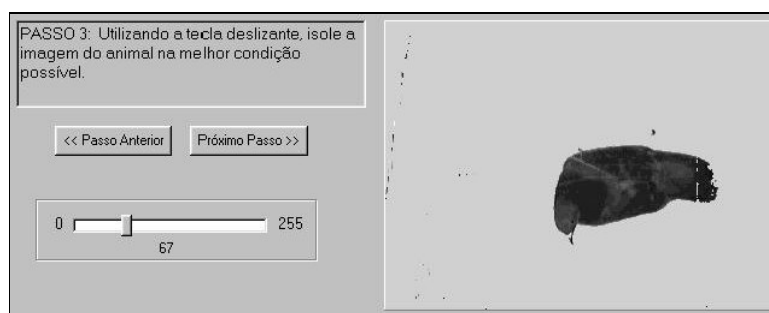


Figura 16 - Parte da etapa de preparação, escolha do limiar de segmentação

b) Ajuste do sistema. É executada pelo pesquisador, que desenha os limites da arena de teste sobre uma imagem da arena na tela do computador, e informa o tamanho da arena em centímetros. Com essas duas informações é obtida a relação de pixels por centímetro, que será usada para informar o valor real das características extraídas pelo sistema (Figura 17).

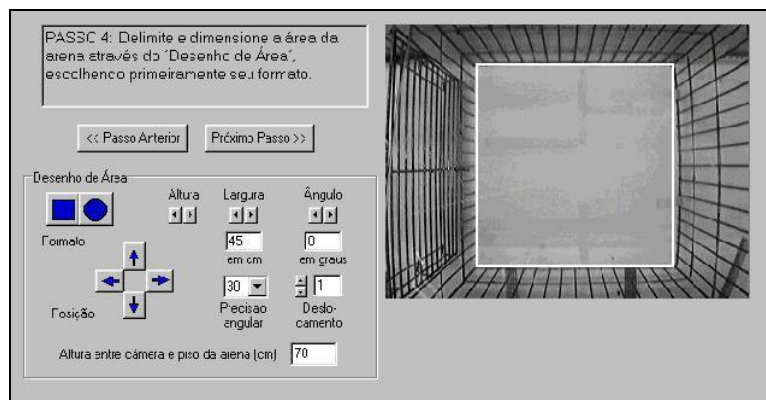


Figura 17 - Parte da etapa de preparação e ajuste do programa

Deve ser tomado cuidado para diminuir o erro total de perspectiva (Gonzales e Woods, 1992): o tamanho da arena deve ser informado quando uma das arestas do desenho passa pelo centro da imagem. Dessa forma, a relação de pixels por centímetro contenha um erro médio de transformação da imagem, por abranger em seu cálculo pixels provenientes de todas as distâncias do plano da imagem. Desde o pixel o mais próximo, logo abaixo da câmera, desprovido de erro, até o pixels mais afastado da câmera, provido maior erro. Esse cuidado não elimina o erro, mas torna-o igual para toda posição da arena, o que é uma vantagem, já que o erro de perspectiva varia com distância entre o ponto de interesse na imagem e o centro da imagem.

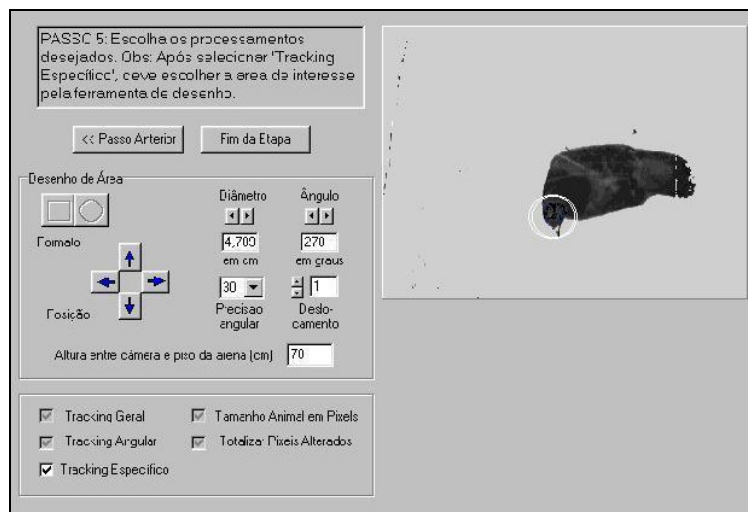


Figura 18 - Parte da etapa de preparação, escolha da parte de interesse a ser rastreada

c) É escolhida a *imagem padrão*, através do posicionamento de uma janela sobre o animal, representada pelo círculo branco na Figura 18. O pesquisador também escolhe o número de imagens que devem formar o banco de imagens padrão, item utilizado na segmentação pelo método de correlação.

5.2 Processamento do vídeo

Esta etapa faz genericamente o processamento do vídeo, a qual segmentado e extraí as características do animal: posição, posição da parte escolhida, direção, comprimento, tamanho (área) e número de pixels alterados entre dois quadros consecutivos. Além disso, algumas operações funcionais são executadas, como a escolha do trecho do filme a ser processado e a exibição, na tela, do rastreamento, das posições calculadas do corpo e da parte sobre o animal (Figura 19).

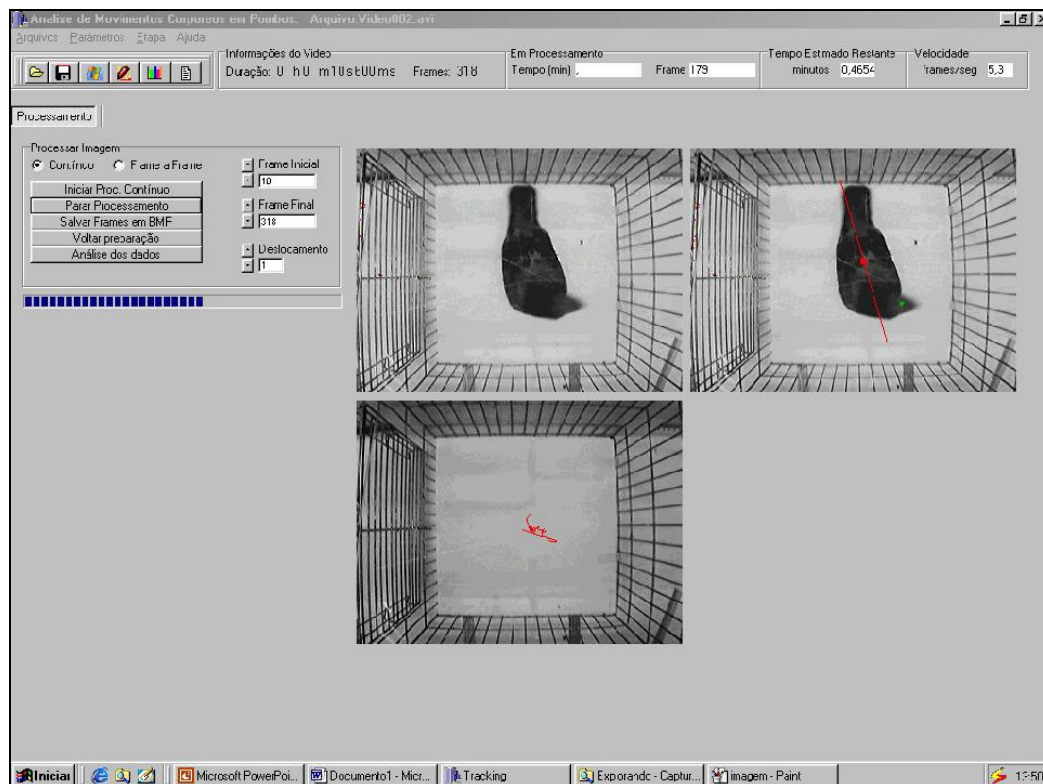


Figura 19 - Etapa de processamento, durante o qual os resultados do rastreamento são exibidos.

5.3 Pós-processamento

Esta etapa usa a matriz de características já extraídas na etapa anterior, para obter as outras características sobre o experimento, comentadas no item 4.6.

As principais atividades desta etapa são:

- a) Classificação do movimento do animal em: locomotor, não locomotor e imobilidade. Essa classificação é feita sobre cada deslocamento do animal entre dois quadros consecutivos, bem como sua comparação com patamares informados pelo pesquisador. Por exemplo: deslocamentos acima de 10 cm serão classificados como comportamentos locomotores, deslocamentos abaixo de 2 cm, serão classificados como comportamentos de imobilidade, e os deslocamentos

entre estes valores serão classificados como comportamentos não-locomotores. Além disso, o conjunto de características discriminadas no item 4.6 é calculado individualmente para cada classificação de movimento.

- b) Escolha do período de janela que deve ser levado em consideração para esta classificação do comportamento.
- c) Escolha das áreas de interesse, através de seu desenho sobre a imagem da arena (Figura 20). Podem ser escolhidas até 6 áreas. Para cada uma das áreas escolhidas são extraídas as características: tempo total de permanência do corpo na área de interesse, número de entradas do corpo na área de interesse, número de entradas da parte pré-escolhida na área de interesse.



Figura 20 - Parte da tela da etapa de pós-processamento

d) Escolha do período de sub-totalização. É feita uma totalização parcial de todas as características a cada período escolhido, considerando as classificações do movimento e as áreas de interesse.

e) O resultado do processamento é uma tabela que contém todos os dados extraídos, com discriminação para as totalizações parciais e completas, para as classificações do movimento e para as áreas de interesse. São incluídas no arquivo informações da área da arena de teste, do tempo do filme, do número de quadros do filme, da relação de pixels por centímetro usada, do fator de limiarização utilizado na segmentação, nome do arquivo originário do filme, e um texto referente à identificação e características do experimento (identificação do experimento, nome do pesquisador, data, etc). É gerado um arquivo em formato CSV, que é armazenado em meio digital.

5.4 Outras Funções

Há ainda uma janela para alterações nos parâmetros de processamento. As alterações destes parâmetros (com exceção do “Fator de mudança do Pixel”) influenciam sobre a velocidade e eficiência do processamento de vídeo.

Os seguintes itens podem ser alterados:

- a) Incremento de centróide, referente à unidade de incremento das coordenadas consideradas no cálculo do centro de massa do animal.
- b) Incremento da diagonal, referente à unidade de incremento das coordenadas levadas em consideração na geração das retas utilizadas no cálculo da direção do corpo do animal.
- c) Componentes da diagonal, referentes ao número de retas consideradas para o cálculo da média que resulta na direção geral do corpo.

d) Raio de busca de janela, referente à unidade de incremento das coordenadas no deslocamento da máscara, ao longo da imagem em processamento, na função de rastreamento por correlação.

e) Incremento de janela, referente à unidade de incremento das coordenadas da máscara consideradas no cálculo da correlação, na função de rastreamento por correlação.

f) Fator de mudança do pixel, referente ao limiar de classificação dos pixels, cujos valores foram alterados entre um quadro e o outro.

Alem disso, o software possui um quadro para receber informações de ordem organizacional do experimento, como identificação do experimento, nome do pesquisador, drogas utilizadas, etc.

6. TESTES DO SISTEMA

Todos os testes foram realizados no LNFI. Muitos dos testes efetuados foram feitos ao longo do desenvolvimento do sistema, uma vez que cada etapa desenvolvida tinha de ser testada para permitir o desenvolvimento de uma nova etapa.

Como já mencionado, os equipamentos utilizados foram: uma câmera WEBCAM PLUS (Creative Labs, USA) e um microcomputador IBM-PC Pentium III 750 MHZ. Empregados em diferentes arenas: uma retangular com armação de ferro e tela, com dimensões de 90x45x50cm, com tampa superior em acrílico transparente para permitir filmagem, e divisória de ferro e tela, que divide o espaço em duas arenas iguais, quando desejado; e outra circular, com dimensão de 75cm de diâmetro e 50cm de altura e paredes de zinco. Os testes foram realizados dentro de uma cabine de experimento, montada com divisórias, e com dimensão de 115x125x320cm.

Os animais utilizados foram ratos e pombos. Estes animais permitiram a análise de situações em que inexistem variações de cor em um animal (como o rato, que é todo branco) ou em animais que apresentam diversas cores (como os pombos).

6.1 Erro de perspectiva nas situações de experimento

Foram feitos testes referentes ao erro de perspectiva nas imagens adquiridas pela WEBCAM, a partir do uso de um objeto de tamanho conhecido, colocado a diferentes distâncias do centro da arena. O erro é a diferença de tamanho do objeto, medido na imagem adquirida, entre as diferentes posições.

A câmera foi fixada a três alturas diferentes: 50cm, 65cm e 80 cm, usadas ao longo dos experimentos. Para cada altura foram adquiridas duas imagens de um gabarito no piso da arena: uma com o gabarito posicionado ao longo do eixo horizontal da imagem (ver exemplo na Figura 21), e outra posicionada ao longo do eixo vertical da imagem. O gabarito foi construído em folha de papel branco com o desenho de duas retas de 20cm, distantes em 30 cm entre si, e duas retas de 4cm, distantes em 25 cm entre si. Em todas as imagens um par de retas foi posicionado no seu centro, para ser usado como referência. As retas maiores foram usadas apenas para auxiliar o posicionamento do gabarito na imagem, e as menores como referência para a medição do erro, pois um objeto grande sofre erros de perspectiva nos pontos do corpo distantes do centro da imagem proporcionais a essa distância.

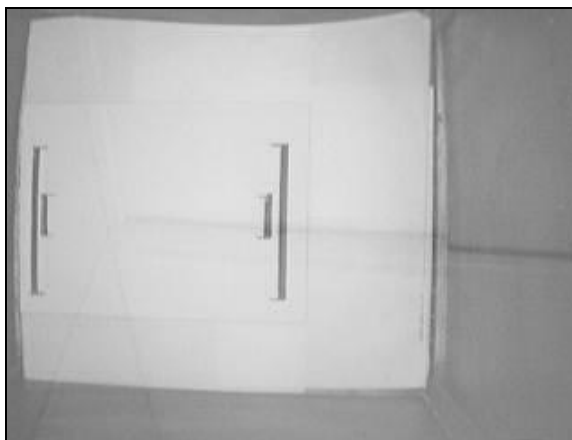


Figura 21 - Exemplo de uma imagem de teste de perspectiva com gabarito formado por retas de tamanho e distâncias conhecidas, disposto ao longo do eixo horizontal da imagem

O erro foi levantado tomando-se a diferença de tamanho das retas menores, no meio e na extremidade da imagem. Esta medida foi feita com uso da etapa de ajuste do software desenvolvido (ver item 5.1) e uma imagem do gabarito em análise mostrada na tela do software. Neste, é feito um desenho sobre os limites da reta no centro da imagem, e em seguida informada sua largura (4 cm) ao

software, e calibra o sistema com a relação pixel/cm real da figura usada. Em seguida, o desenho é alterado e posicionado sobre os limites da reta mais afastada do centro da imagem, e as dimensões reais são informadas pelo software e anotadas. A diferença entre o tamanho dos dois objetos é atribuída ao erro de perspectiva.

O tamanho dos objetos ao centro e os mais afastados apresentou redução, e o posicionamento do gabarito na posição horizontal ou vertical da imagem não apresentou diferença no erro. Foram observadas as seguintes medições: com a câmera fixada a 50 cm, o sistema reduziu a reta de 4cm para 3,5 cm (12,5%); para uma altura de 65cm, o sistema reduziu a reta de 4cm para 3,7 cm (7,5%); e para uma altura de 80cm, o sistema reduziu a reta de 4cm para 3,8 cm (5%).

O erro mais relevante foi encontrado nas imagens adquiridas com câmera a 50 cm de altura, pois os limites da arena ficaram próximos aos da imagem, enquanto nas demais o aumento da altura reduziu a arena e a aproximou do centro. Desta forma foi possível verificar o erro na medição de posição e tamanho de um animal que perambule na periferia da imagem o que pode ser corrigido, levando-se em conta a distância de cada ponto do animal em relação ao centro da imagem. Porém, devido ao custo computacional deste cálculo, foi adotada outra solução, apresentada no item 5.1 como forma de minimizar o erro. No momento do ajuste, a largura da arena é informada ao software pelo desenho sobre a mesma, porém com a reta referente a sua largura passando no centro da imagem. Assim, a medida contém pontos em posições próximas e em posições afastadas do centro da imagem, e sobre influência de todos os erros, o que resulta em um erro médio de posição e tamanho do animal em qualquer lugar da arena. Assim, para o teste com a câmera a 50cm de altura, o erro fica em torno de 6% em qualquer ponto da arena.

6.2 Limitação dos softwares de compactação para uso no sistema

Foram testadas duas características de diferentes softwares de compactação de vídeo para os arquivos de vídeo gerados: a velocidade de compactação e a capacidade de redução do arquivo.

Foram feitos 3 filmes sucessivos, de 1 minuto cada, usando o mesmo animal e o mesmo ambiente, e todos os arquivos foram gerados em formato AVI.

A velocidade de compactação é observada pela taxa real de amostragem exibida pelo arquivo após sua compactação (ver item 4.2). A taxa foi verificada com o uso do software desenvolvido (ver item 5.2), que extrai de um arquivo de vídeo processado a informação do total de pixels alterados entre dois quadros sucessivos. O quadro que apresenta o total de pixels iguais a zero, é considerado um quadro idêntico ao quadro anterior, o que indica que o software de compactação repetiu o quadro. Ou seja, o compactador não conseguiu adquirir e compactar uma imagem nova a tempo de incluí-la no arquivo, dentro do tempo de exigência de formato AVI (30fps), repetindo apenas o último quadro adquirido.

Tomando-se o número de quadros não repetidos e o tempo total do arquivo foi possível verificar a velocidade real de compactação. No teste, um arquivo que não usou software de compactação apresentou uma velocidade real de 13 fps, um arquivo compactado com o software Indeo 5.0.4(Ligos, San Francisco, USA) apresentou uma velocidade real de 6 fps e o arquivo compactado com o software DIVX 5.03(DivXNetworks, Inc.) apresentou uma velocidade real de 29 fps.

Com os mesmos arquivos, também foi observada a taxa de compressão do arquivo. Onde o arquivo gerado sem compactação apresentou 300Mbytes/minuto de filme, o compactador Indeo 5.0.4 apresentou taxa de 150:1, com a redução do

arquivo para 2 Mbytes/minuto, similar ao arquivo gerado pelo compactador DIVX 5.03, que apresentou taxa de 136:1 com redução para 2,2 Mbytes/minuto.

Assim, o software de compactação DIVX 5.03 foi adotado para uso com o sistema, por permitir substancial compactação do arquivo de vídeo sem perdas de quadros, isto é, sem comprometer o processamento da informação requerida.

6.3 Testes com o software desenvolvido

6.3.1 Segmentação do corpo

Foram processados 21 filmes de pombos de diversas cores, filmados individualmente em uma arena de teste retangular, com paredes escuras e um fundo de cor branca ou preta (de acordo com o contraste com a cor do animal). Os filmes tinham duração de 10 minutos e foram processados integralmente. Em 20 filmes, obteve-se a segmentação do corpo do animal, ao longo de toda extensão do registro, entretanto em um filme obteve-se apenas uma segmentação parcial do corpo do animal, isto é, em alguns trechos do arquivo o animal não foi segmentado. O resultado da segmentação indicado pelo processamento foi aferido por um observador externo que o comparava com sua própria percepção de segmentação do animal; observado concomitante ao processamento do vídeo.

A segmentação parcial foi observada no primeiro filme da série, que apresentava iluminação forte e saturava as cores do animal e do fundo, o que acabou por reduzir o contraste e prejudicou a segmentação. O problema não ocorreu novamente após a redução da iluminação, como foi verificado nos 20 filmes com segmentação total.

6.3.2 Tamanho do animal possível de segmentação

Foram analisados 7 filmes com duração média de 15 segundos, de um camundongo de cor branca, filmado em uma arena circular, com paredes de zinco não pintado e piso de cor preta, com a câmera fixada a 65cm, 70cm, 75cm, 80cm, 85cm, 90 cm e 95cm de altura do piso da arena. As filmagens foram efetuadas com a câmera às alturas de 65cm, 70cm, 75cm, 80cm, 85cm, 90 cm e 95 cm, sendo que nas três últimas alturas os dados provenientes do processamento dos vídeos apresentaram inconsistência de resultados, de acordo com a percepção de um observador. Nestes casos, por exemplo, enquanto o animal estava da periferia da arena, o ponto de centro calculado indicava como se estivesse no centro da imagem. Este processamento errôneo foi atribuído ao tamanho do animal que não foi suficiente para processamento adequado de seus atributos. Nestas últimas imagens obtidas, o animal apresentou tamanhos de 1430 pixels, 1210 pixels e 910 pixels, para uma imagem total de 76800 pixels (320x240 pixels). O que mostra um limite de tamanho mínimo dos objetos para que estes sejam analisados corretamente. Sugeriu-se um animal de mínimo de 2% do tamanho da imagem total adquirida.

6.3.3 Segmentação da parte escolhida

Foram processados 8 filmes utilizando pombos de diversas cores, filmados individualmente em uma arena de teste retangular, com paredes escuras e um fundo de cor branca ou preta (de acordo com contraste com a cor do animal). Os filmes tinham duração de 10 minutos, foram processados integralmente, e a parte escolhida para rastreamento foi a cabeça do animal.

Dos 8 filmes testados, em apenas um o rastreamento foi correto por todo o tempo de vídeo, em relação à percepção de um observador. Em cinco filmes houve grande inconstância de resultados, com uma seqüência de quadros rastreados corretamente seguidos de uma seqüência de quadros rastreados erroneamente; e em dois filmes não houve o rastreamento correto em momento algum.



Figura 22 - Mostra pombo marcado com triângulo de papel preso a cabeça para facilitar rastreamento

6.3.4 Segmentação da parte escolhida com o uso de um marcador

Foram processados 2 filmes, com duração de 5 minutos cada, utilizando cada qual um pombo de cor escura, em uma arena de teste retangular, com paredes escuras e fundo de cor branca. Um dos pombos era provido de uma marca de papel cor de cinza claro colocada na cabeça. O papel tinha formato de triângulo isósceles e dimensionamento de 0,6 cm x 1,2 cm (ver Figura 22). Os filmes foram processados integralmente, e a cabeça foi a parte escolhida para ser rastreada.

Em ambos os filmes, o rastreamento não foi correto, com momentos de rastreamentos corretos intercalados de incorretos. O filme que continha o animal marcado apresentou períodos de rastreamento correto predominantes sobre os de rastreamentos incorretos, em 90% do tempo do arquivo processado, de acordo com a percepção de um observador, enquanto o filme que continha o animal não marcado

apresentou períodos de rastreamento correto não superior a 50% do tempo do arquivo processado, também segundo o mesmo observador.

O fato demonstra que a segmentação de parte do animal pelo método utilizado se torna mais eficiente se a parte estiver marcada.

6.3.5 Teste da etapa de pós-processamento

Para os testes da etapa de pós-processamento foi montado um filme no qual o objeto se desloca de forma previsível sobre uma arena. O filme, de 4 minutos, possui um disco de cor preta, que se desloca em linha reta de um lado ao outro da arena de teste, por uma distância de 50 cm, por 15 vezes, com um tempo médio de 15 segundos para cada percurso. Neste teste procurou-se verificar a adequação das medidas do número de vezes que um objeto entra em uma área de interesse (área A e B) e do seu tempo de permanência em cada uma destas áreas. No software, o filme de teste foi processado integralmente, e na etapa de pós-processamento foram escolhidas as duas área de interesse (ver Figura 23).

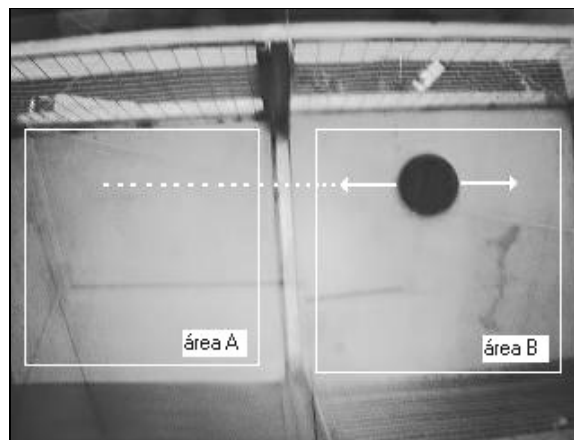


Figura 23 - Objeto e a arena de teste de parâmetros, utilizados para o teste da etapa de pós-processamento.

O sistema foi eficaz no processamento e apresentou corretamente o total de 8 entradas do objeto na área A e 8 entradas na área B, com um tempo de permanência de aproximadamente 120 segundos em cada uma das áreas, valores semelhantes àqueles estipulados na realização do filme de teste, o que demonstra a análise correto do sistema .

6.4 Teste em situação experimental: o efeito de drogas neuroativas sobre a atividade locomotora e não-locomotora em ratos colocados em um campo aberto

Os experimentos e resultados abaixo descritos foram conduzidos e obtidos no sentido de testar o sistema aqui apresentado em uma situação experimental real e de interesse do LNFI, e representam atividades-piloto de parte de um projeto de pesquisa cujos procedimentos éticos foram aprovados pela CEUA-UFSC (proc. 149/CEUA, certificado 23080.009607/2002-88). Os animais experimentais foram tratados com drogas que afetam a locomoção de formas opostas. A primeira delas, o Haloperidol, é uma droga largamente utilizada na clínica como antipsicótico (por exemplo no tratamento de manifestações esquizofrênicas). Um dos efeitos de injeções desta droga é uma intensa redução na atividade locomotora (tanto em humanos quanto em ratos colocados em um campo aberto, ver e.g. Lee e Clifton, 2002). A outra droga utilizada foi a Cafeína, um psicoestimulante cujo efeito hiperlocomotor tem sido repetidamente relatado (ver, e.g., Antoniou et al., 1998). Nestes testes foi utilizado um total de 8 ratos adultos machos, pesando entre 250-270 g e mantidos com água e comida *ad libitum* em gaiolas coletivas (com no máximo 3 ratos) em ambiente com controle de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuridão) e de temperatura (entre 24 e 27 °C) no biotério setorial do CFS. Estes animais receberam injeções intraperitoneais de Haloperidol (N= 4; Haldol,

Janssen-Cilag, 0,25 mg/Kg de peso corporal, dissolvido em NaCl, 0,9% e 1% de ácido láctico), Cafeína (N= 4; Sigma, 10 mg/Kg de peso corporal, dissolvida em água bidestilada com 2 gotas de Tween 80). Estas injeções foram administradas 20 minutos antes do início do teste, que consistiu na colocação do animal tratado em um campo aberto no qual ele nunca havia estado antes (uma arena de teste circular de 75 cm de diâmetro, com paredes de folha zinco com 45cm de altura e um fundo de cor cinza escuro). As atividades do animal neste ambiente eram registradas durante 10 minutos pela WEBCAM postada acima do campo aberto, e armazenadas em CDs para posterior análise. Os animais eram então recolocados em suas gaiolas-residência.

Os resultados ainda estão em fase de análise no LNFI. A seguir são apresentados resultados do processamento, pelo sistema aqui desenvolvido, dos filmes de 10 minutos de um animal tratado com Haloperidol e de um animal tratado com Cafeína. Neste processamento foram obtidas imagens de rastreamento dos animais ao longo de todo o registro (ver Figura 24-b e Figura 25-b). Na etapa de pós-processamento foi estipulado que deslocamentos do animal acima de 5 cm seriam classificados como comportamento locomotor, enquanto que deslocamentos abaixo de 1 cm seriam classificados como ausência de locomoção ("imobilidade"). Deslocamentos entre estes valores foram tomados como atividade não-locomotora. Estes índices foram obtidos em janelas sequenciais de 6 segundos. Foi estipulada, ainda, uma área de interesse na região central da arena (ver Figura 24-a e Figura 25-a) e foram feitas totalizações parciais dos dados extraídos em períodos sequenciais de 0,5 minutos ao longo de todo o filme (gráficos nas figuras). Os dados obtidos pelo pós-processamento foram utilizados para as análises das diferenças

nos efeitos das drogas acima mencionadas sobre a atividade dos animais no campo aberto, como indicada a seguir.

Na Figura 24-b e Figura 25-b nota-se que os animais tratados com Cafeína parecem ter percorrido distâncias maiores que os animais tratados com Haloperidol durante o mesmo período de tempo, confirmando os efeitos destas drogas, relatados na literatura e acima mencionados.

Este resultado é confirmado pela análise da Figura 26, que indica um aumento na distância percorrida pelo animal tratado com Cafeína em relação ao animal tratado com Haloperidol. Deve ser notado que a análise do número de pixels alterados nestas duas situações (Figura 27) reproduz a observação da distância percorrida. Este efeito pode ser explorado no sentido de se verificar se medidas mais simples (como variações em pixels) poderiam substituir ou representar o processamento mais elaborado exigido pelas medidas de distância percorrida.

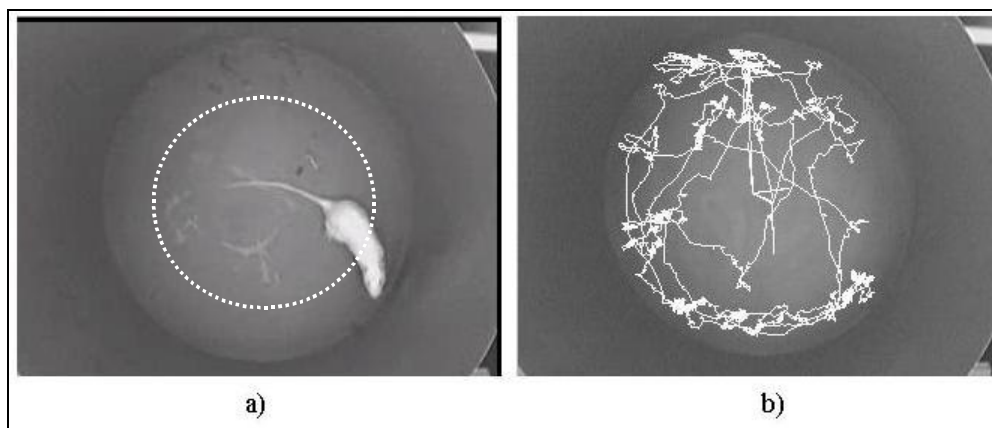


Figura 24 – Rastreamento de um animal, em um teste de campo aberto, que recebeu a administração de Haloperidol. a) O animal e uma área de interesse central; b) O rastreamento de animal durante o teste.

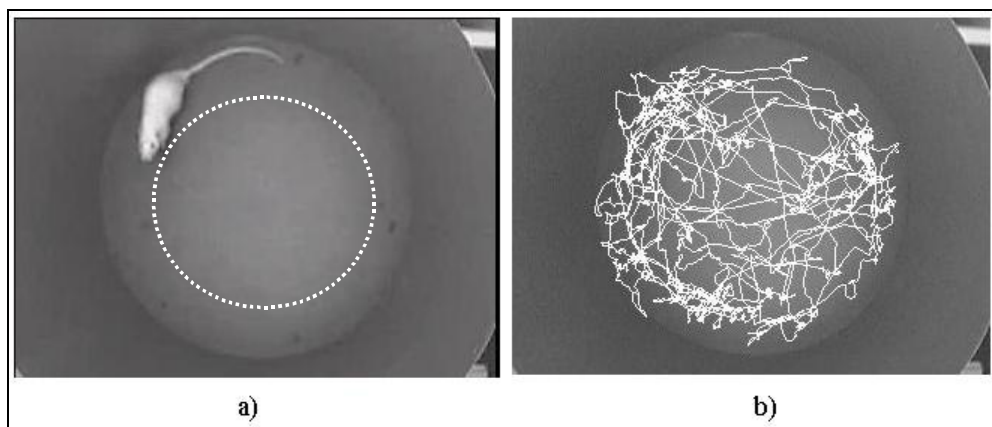


Figura 25 - Rastreamento de um animal, em um teste de campo aberto, que recebeu a administração de Cafeína. a) O animal e uma área de interesse central; b) O rastreamento de animal durante o teste.

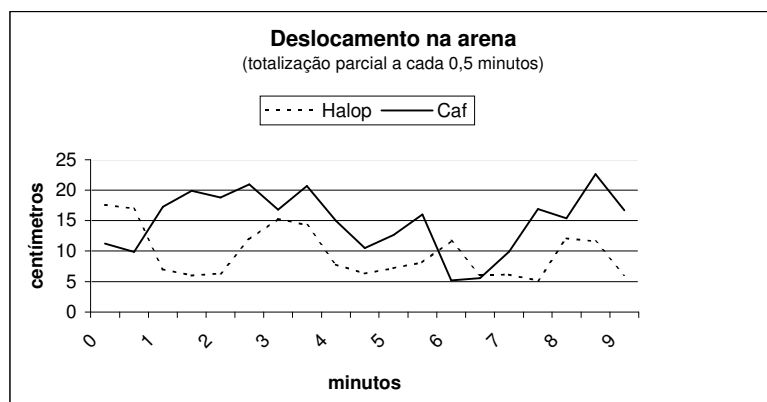


Figura 26 – Gráfico de deslocamento dos animais ao longo do teste.

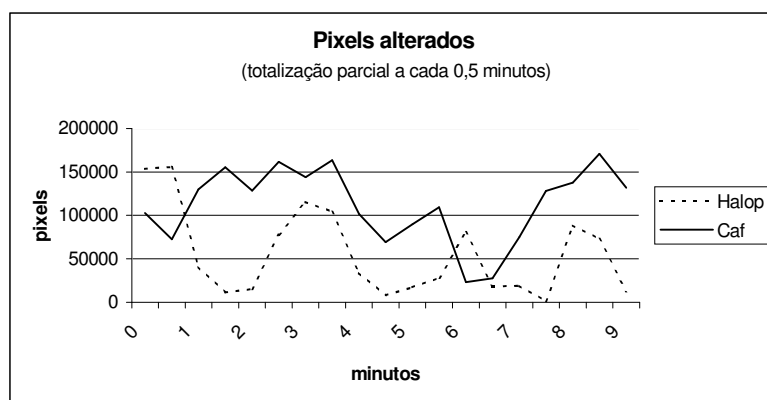


Figura 27 – Gráfico de pixels alterados dos animais ao longo do teste.

	Drogas testadas	
Classificação do deslocamento	Haloperidol	Cafeína
Locomotor (cm)	82,4 (43 %)	235,7 (83,7%)
Não-locomotor (cm)	104,6 (56.4 %)	44,3 (16,8%)
imobilidade (cm)	1,5 (0,6 %)	1,5 (0,5 %)

Tabela 1 – Deslocamento do animal por classificação de comportamento, e total de mudanças de comportamento ao longo do teste.

Deve ser notado ainda que o sistema permitiu verificar que a atividade locomotora (o deslocamento real do corpo do animal no espaço da gaiola) responde por cerca de 83 % de toda a atividade do animal tratado com Cafeína, enquanto o animal que recebeu Haloperidol distribui igualmente sua baixa atividade geral entre locomoção e outras atividades corporais (ver tabela 1). Surpreendentemente, o tempo que ambos os animais despendem em imobilidade parece ser semelhante após ambos os tratamentos.

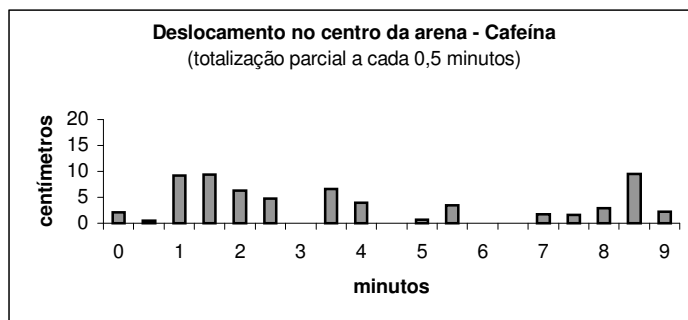
A análise comparando as atividades do animal em uma área central da arena, correspondente a 50 % da área total da mesma (ver Figura 24 –a e Figura 25-b), revela que, apesar das diferenças em distância percorrida e tipo de atividade, o animal permanece mais tempo na periferia do que no centro da arena após ambos os tratamentos (ver tabela 2 e Figura 28). Deve ser notado que animais não tratados com drogas geralmente preferem a periferia da arena, comportamento esse chamado de tigmotaxia (ver exemplo na introdução). Drogas ansiolíticas geralmente atenuam esta preferência, sugerindo que o centro da arena tem caráter aversivo para estes animais. As observações permitidas pelo sistema adequado indicam que, embora tenham afetado vários atributos da locomoção, nem o Haloperidol nem a Cafeína alteraram a referida preferência, sugerindo que

nenhuma destas drogas afeta o "medo" que o animal apresenta em relação ao meio da arena.

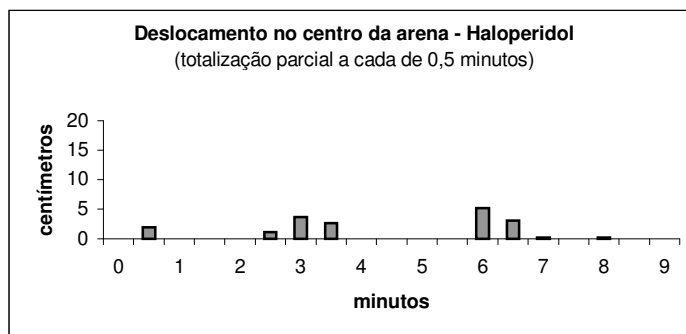
Todas estas observações devem ainda ser analisadas frente a um número maior de animais e devem ser submetidas a testes estatísticos adequados. No entanto, estes experimentos podem demonstrar a utilidade, precisão e rapidez do sistema desenvolvido em auxiliar na exploração dos efeitos comportamentais de drogas neuroativas.

Deslocamento por área	Drogas testadas	
	Haloperidol	Cafeína
Área Central (cm)	17,9 (9,7 %)	64,9 (23 %)
Periferia (cm)	165,4 (90,3 %)	216,6 (77 %)
Total (cm)	183,3	281,6

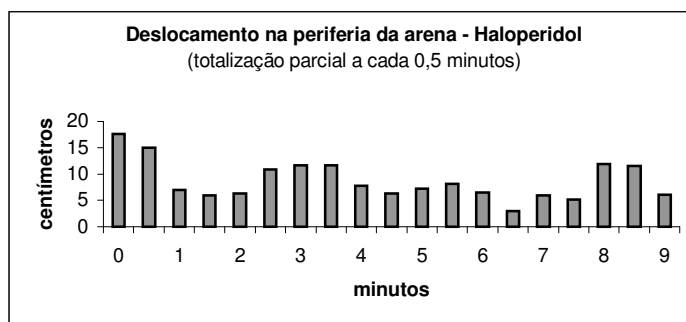
Tabela 2 - Deslocamento do animal por área, e total de entradas do animal na área central.



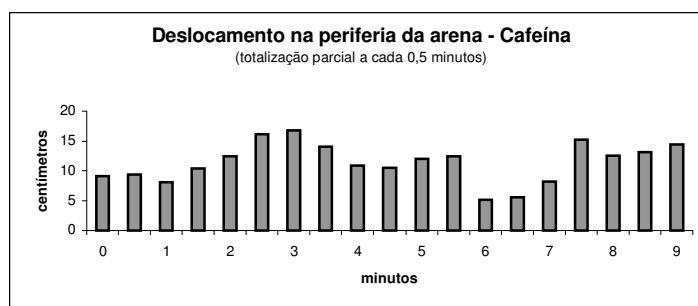
a)



b)



c)



d)

Figura 28 - Gráficos das distribuição de deslocamento dos animais ao longo do este.
a)Deslocamento do animal tratado com Haloperidol pelo centro da arena; b)Deslocamento do animal tratado com Cafeína pelo centro da arena; c) Deslocamento do animal tratado com Haloperidol pela periferia da arena e d)Deslocamento do animal tratado com Haloperidol pela periferia da arena.

7. DISCUSSÃO

A utilização de câmeras tipo WEBCAM como elemento de aquisição de vídeo em experimentos com animais de laboratório demonstrou serem elas adequadas às condições para as quais o sistema foi planejado. Com as observações feitas nos testes em realizados, a câmera pode ser utilizada em experimentos nos quais os animais:

A conexão tipo USB simplifica a tarefa de implementação a um simples cabo, e pode ser utilizada em qualquer computador. A aquisição direta de imagens em vídeo digital reduz os equipamentos necessários ao sistema de rastreamento e permite aproveitar constantes evoluções tecnológicas. Por exemplo, o codificador DIVX 5.03 (DivXNetworks, Inc.), adotado durante o desenvolvimento deste sistema, aumentou em 500% a taxa de amostragem dos arquivos gerados com a WEBCAM, em relação ao codificador usado anteriormente (Indeo 5.0.4 ,Ligos, San Francisco, USA). A disponibilidade de novas WEBCAM's, que trabalham com taxas de aquisição de 60fps, abre caminho para novas possibilidades de aplicação, como permitir a medida de tremor ou outros movimentos discretos em animais (capítulo 1). Os resultados no uso da WEBCAM foram considerados satisfatórios para o tipo de aplicação aqui estudada, apesar do erro de perspectiva observado de até 12,5%, da falta de mecanismos para considerar e anular ruído de aquisição das imagens e a não consideração de ruído causado pela possível perda de informação gerado na codificação na imagem em vídeo, pontos que merecem ser abordados em trabalhos futuros.

O método de rastreamento do corpo demonstrou ser robusto, ao segmentar os animais em 95% dos filmes testados, sendo afetado apenas por condições aberrantes de iluminação.

O método por subtração da cena de fundo aplicado em conjunto com a foto da cena estática inicial do teste deve ser usado com parcimônia. É imprescindível que as fotos e filmes utilizados possuam a mesma condição de posição e tenham as mesmas características de edição de imagem (como contraste, brilho, etc), e ainda, que a câmera permaneça fixa na posição inicial ao longo da filmagem. Isto garante que a cena de fundo seja fiel à imagem de fundo do filme, onde qualquer diferença acrescenta ruído à imagem segmentada. É interessante notar que o uso da WEBCAM e do método de segmentação adotado apresentaram total afinidade neste ponto, pois foi possível adquirir a cena inicial e o filme com a mesma câmera, na mesma posição, com os mesmos fatores de edição. Ainda, o uso de programas de compressão de vídeo introduziram alterações nas imagens e conseqüente ruído na segmentação, mas sua influência não foi suficiente para ser notada durante os testes realizados.

Para o método de segmentação de uma parte de interesse no animal, os testes indicam que os algoritmos usados não apresentaram resultados satisfatórios, se comparado à avaliação de um observado. Dois aspectos devem ser considerados sobre a segmentação: quanto ao método adotado e quanto aos objetos rastreados. Os métodos de segmentação são escolhidos em função das características dos objetos a serem rastreados. Em geral, os objetos segmentados apresentam algumas características constantes que permitem sua identificação ao longo de um deslocamento. No entanto, uma parte de um animal que pode sofrer muitas alterações ao longo de um deslocamento, e em um animal que move, por exemplo a

cabeça, as alterações de rotações longitudinais da parte de interesse dificilmente poderiam ser simuladas em sistemas de duas dimensões (uma câmera).

Diante das muitas alterações de textura da parte escolhida fica difícil indicar um método adequado para tal situação. Neste trabalho foi adotado o método por correlação, o qual, comparado com o método estatístico, apresentou maior eficiência durante os testes na etapa de desenvolvimento. Porém, seu desempenho é fortemente condicionado pelas diferenças entre a textura da pelagem da parte de interesse do animal e a textura do resto do corpo do animal. Com a limitação da área de busca da parte escolhida em torno da área de sua localização anterior, o método apresentou bons resultados em aplicações onde objeto é pouco alterado ou o objeto não se altera ao longo do deslocamento, situação encontrada na literatura (ver Fieguth e Terzopoulos, 1997; e Nickels e Hutchinson, 1999). A possibilidade de escolha do valor de incremento da máscara mostrou-se eficiente no rastreamento e na manutenção da velocidade de processamento, mesmo com alteração do tamanho dos objetos rastreados.

O uso de um controle preditivo (Haykin, 1996) na busca do ponto de maior semelhança no método por correlação, auxiliado pela indicação do fluxo do movimento (Intel, 1999), pode proporcionar aumento na taxa de acerto do método. A implementação deste controle, no sistema aqui apresentado, pode orientar na busca da parte escolhida para uma área de maior possibilidade de acerto, o que reduziria o tempo de processamento e aumentaria a eficiência de busca. Esta constitui-se uma otimização que fica como sugestão para trabalhos futuros sobre esta proposta de sistema de rastreamento.

Outra possibilidade quando a aplicação apresenta um objeto com deslocamento em todas as direções, como o animal no espaço, é o uso de sistemas

com três dimensões (duas ou mais câmeras). Tais sistemas permitiriam, por exemplo, fazer um filme com duas câmeras em lados diferentes do animal, e assim gerar informações suficientes para identificar a parte de interesse em qualquer posição e em movimentos mais complexos. Esta poderia ser uma boa solução, e alguns trabalhos têm sido desenvolvidos neste sentido (Hartmann et al., 2000; Eian e Poppele, 2002). No entanto, dificuldades como a necessidade de sincronismo de quadros adquiridos por diferentes câmeras ao mesmo tempo, o aumento da complexidade dos algoritmos e o aumento do tempo de processamento dos filmes não tem incentivado seu uso.

A marcação do animal para teste é uma opção plausível para o uso do sistema, capaz de rastrear a marca durante o teste. No entanto, é uma opção que poderá ser decidida pelo próprio pesquisador em função de suas condições de pesquisa. Não foram feitos testes em número suficiente de marcas para identificar os limites de um rastreamento feito desta forma.

Uma breve comparação entre o sistema desenvolvido e os sistemas existentes no mercado (Schwartz et al., 1993; Sams-Dodd, 1995; Spink et al., 2001; Schwarz et al., 2002) é dificultada pela falta de detalhamento das soluções de processamento de imagens nos referidos sistemas. Algumas informações isoladas nos textos demonstraram que alguns destes utilizam o método por subtração de plano de fundo. Ainda nestes sistemas a cena parece ser estipulada da forma estatística (ver item 3.2.4.a), o que confere menor velocidade de processamento e incumbe o usuário de uma tarefa difícil: a escolha do número de amostras para gerar a cena de fundo.

8. CONCLUSÕES

O trabalho resultou em um sistema que possibilita o registro e a quantificação do comportamento de animais usados em laboratório, a partir da análise de vídeo digital de testes experimentais com os animais. O trabalho focou a aplicação do sistema no teste tipo Campo aberto (“Open Field”), mas também pode ser aplicado a outros testes como o “Water Maze” e o “Elevated Plus Maze”, comuns a investigações nas Neurociências.

As características básicas de uso do sistema desenvolvido foram delineadas pelas técnicas empregadas e observações durante os testes realizados. Quanto ao animal utilizado, deve apresentar cor de contraste com a cor de fundo da arena; deve idealmente ocupar entre 5% e 10% da área da arena e o ponto de interesse no corpo deve estar marcado de forma contrastante. A filmagem do animal deve ser tomada pela parte superior da arena, devendo esta ser livre de grades ou fechada por elemento transparente (vidro, acrílico). O arquivo de vídeo deve ser gerado em preto e branco, com resolução de 320x240 pixels, extensão AVI e 30 fps. O software de processamento é capaz de analisar apenas um animal por filme, com o rastreamento do corpo e de uma parte escolhida de forma simultânea, notado que são observados apenas os movimentos realizados dentro da área especificada na preparação do processamento. O processamento extrai as características iniciais de posição do corpo, de posição da parte escolhida, de direção, de comprimento, de tamanho (área) e do número de pixels alterados entre quadros consecutivos. Posteriormente, são feitas análises e totalização da atividade comportamental sobre a área total da arena e sobre até seis áreas que podem especificadas. No final é gerado um arquivo gráfico contendo a trajetória realizada pelo animal durante todo o período analisado e um arquivo de relatório em arquivo CSV com dados sobre o experimento, totalizações em períodos determinados e classificação dos movimentos do animal, que resultam nas informações: Total de deslocamento do corpo, Velocidade média, Tempo total de permanência na área de interesse, Número de entradas na área de interesse, Número de entradas da parte escolhida do animal na área de interesse, Total de deslocamento da parte escolhida, Total

distância entre corpo e a parte escolhida, Total de deslocamento angular do corpo em sentido horário e Total de deslocamento angular do corpo em sentido Anti-horário, Total de Mudanças de Comportamento, Total de Pixels Alterados.

Os dados obtidos favorecem ao pesquisador um detalhamento do comportamento. Por exemplo, a *classificação do comportamento* e o *total de deslocamento* realizado podem indicar que a ação de uma droga mantém um animal em deslocando maior e por mais tempo do que um animal que recebeu veículo, como visto no capítulo 6.4, em teste real. Muitos outros indicativos podem ser extraídos do sistema como o *número de entradas do animal em uma área de interesse* e o seu *tempo de permanência*, com os quais o pesquisador pode vir a observar preferência do animal por uma área da arena a outra; unindo a informação de *total de mudanças de comportamento*, poderia ser concluído se essa área de interesse influencia ou não uma troca do comportamento do animal. A classificação de movimentos como *não-locomotor* unido ao *número de pixels alterados* podem identificar momentos nos quais o animal está parado mas movimentando algumas partes do corpo, como ocorre ao realizar os comportamentos coçar e lambar. Apesar de poder identificá-los exatamente, pode-se medir uma atividade total destes comportamentos, o que possibilita acompanhar os período de ocorrência destes acontecimentos e sua intensidade. Muitas outras observações podem ser feitas pelo pesquisador ao combinar as diversas variáveis encontradas pelo sistema.

O sistema ferramenta o pesquisador para extrapolar os dados colhidos pelo sistema de observação direta, com o aumentando da quantidade e da precisão das informações coletadas. Por consequência obtém-se uma caracterização mais ampla da ação de uma droga.

Em resumo, o desenvolvimento deste sistema possibilitou o registro automático de parâmetros de comportamento locomotor em pombos e ratos, como posição do corpo e total de deslocamentos, úteis para a detecção de efeitos de drogas nestes animais. Assim, o sistema contemplou o objetivo inicial deste trabalho, e

estabelece os passos iniciais do desenvolvimento de um sistema mais amplo, destinado à extração automática de atributos comportamentais em animais de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANTONIOU K., KAFETZOPOULOS E., PAPADOPOULOU-DAIFOTI Z., HYPHANTIS T., MARSELOS M.: *D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats?* . Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 23, pp. 189-196, 1998 (Antoniou et al., 1998)
- [2] BALDO, B.A.; SADEGHIAN, K.; BASSO, A.M.; KELLY; A.E.: *Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity*. Behavioral Brain Research. Vol 137, pp 165-177, 2002. (Baldo et al., 2002)
- [3] BARRET, J.; ZHANG, L.; GLESSON, S.; GLAMBE, E. H.: *Anxiolytic and antidepressant mechanisms of 5 HT1A drugs in the pigeon: Contributions from behavioral studies*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. Vol 18, pp. 73-83, 1994. (Barret et al., 1994)
- [4] BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J.: *Emotional changes related to age in rats - a behavioral analysis*. Behavioral Brain Research , Vol 133, pp 323-332, 2002. (Boguszewski e Zagrodzka, 2002)

- [5] BOURIN, M.; HASCOËT, M.: *The mouse light / dark box test*. European Journal of Pharmacology , Vol 463, pp 55– 65, 2003. (Bourin e Hascoët, 2003)
- [6] BRUDZYNSKI, S.M.; KROL, S.: *Analysis of locomotor activity in rat: parallelism index, a new measure of locomotor exploratory pattern*. Physiology & Behavior, Vol62 , No 3, pp 635-642, 1997. (Brudzynski et al., 1997)
- [7] BRUN, S.R.M.; FERNANDES, M.F.; DA LUZ, V.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J.: *A typical Angiotensinergic Receptors May Mediate Both Angiotensin II- And Serotonin-Induced Water Intake In Pigeons*. Annals of the III International Symposium on Vasoactive Peptides, pp 65, Belo Horizonte, Brazil,1999. (Brun et al., 1999)
- [8] BRUN, S.R.M. ; LUZ, V.; FERNANDEZ, M.F.; PASCHOALINI, M.A. AND MARINO-NETO, J. , *Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons*. Regulatory Peptides, Vol 98, pp 127-135, 2001. (Brun et al., 2001)
- [9] CHASSAIN, C.; ESCHALIER, A.; DURIF F.: *Assessment of motor behavior using a video system and a clinical rating scale in parkinson monkeys lesioned by MPTP*. Journal of Neuroscience Methods, Vol 111, pp 9-16, 2001. (Chassain et al., 2001)

- [10] DARIO, A.J.S.; LOPES, P.R.C.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A. e MARINO-NETO, J. : *Electrographic patterns of postprandial sleep after food deprivation or intraventricular adrenaline injections in pigeons*. Brain Res., Bull, Vol 39, pp 249-254, 1996. (Dario et al., 1996)
- [11] EIAN, J.; POPPELE, R.E.: *A single-camera method for three-dimensional video imaging*. Journal of Neuroscience Methods, Vol 120, pp 65-83, 2002. (Eian e Poppele, 2002)
- [12] FIEGUTH, P.; TERZOPOULOS, D.: *Color-based tracking of heads and other mobile objects at video frame rates*. Computer Vision and Pattern Recognition, 1997. Proceedings., 1997 IEEE Computer Society Conference, Vol 179, pp 21-27, 1997. (FIEGUTH E TERZOPOULOS,1997)
- [13] FITZGERALD, R.E.; BERRES, M.; SCHAEPPPI, U.: *Validation of a photobeam system for assessment of motor activity in rats*. Toxicology, Vol 49, pp 433-439, 1988. (Fitzgerald et al., 1988)
- [14] FONSECA, A.S.; PEREIRA, F.R.; SANTOS, R.: *Validation of a new computaterized system for recording and analysing drug-induced tremor in rats*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol 46, pp 137-143, 2002. (Fonseca et al., 2002)

- [15] GARZA, R.L.; CUNNINGHAM, K.A.: *The effects of the 5-Hydroxytryptamine_{1A} Agonist 8-Hydroxy-1-(di-n-propylamino) tetralin on Spontaneous Activity, Cocaine-Induced Hyperactivity and Behavioral Sensitization: A Microanalysis of Locomotor Activity*. The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics, Vol 92, No 2, pp 610-617, 2000. (Garza e Cunningham, 2000)
- [16] GENNIP, E.M.S.J. VAN; BERKHOUDT, H.: *Ontogeny of feeding in pigeons: a cinefluoroscopic and electromyographic analysis*. The Journal of Experimental Zoology, vol 269, pp 489-506, 1994. (Gennip e Berkhoudt, 1994)
- [17] GEYER, M.A.; RUSSO, P.V.; MASTEN, V.L.: *Multivariate assessment of locomotor behavior: pharmacological and behavioral analyses*. Pharmacology Biochemistry & Behavior, Vol 25, pp 277-288, 1986 (Geyer et al., 1986)
- [18] GEYER, Mark A: *Approaches to the characterization of drug effects on locomotor Activity in Rodents*. Modern Methods in Pharmacology, vol 6, pp 81-99, 1990. (Geyer, 1990)
- [19] GLEESON, S.; WEISSMAN, B.A.; SEGSEL, M.R.; BARRETT J.E.: *Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons*. Eur J Pharmacol, Vol 229:2-3, pp 109-115, 1992. (Glewson et al., 1992)

- [20] GONZALES, R.C.; WOODS, R.E.: *Digital Image Processing*. 1^a edição . Reading: Addison-Wesley,1992. (Gonzales e Woods, 1992)
- [21] GROSSMANN, M.; SKINNER, M.H.: *A simple computer based system to analyze Morris water maze trials on-line*. Journal of Neuroscience methods, Vol 70, pp 171-175, 1996. (Grossmann e Skinner, 1996)
- [22] GUO, D.; HWANG, Y.C.; ADRIAN, Y.C.L.; LAUGIER, C.: *Traffic Monitoring using short-long term background memory*. The IEEE 5th Inter Conference on intelligent Transportation Systems, Singapore, 2002. (Guo et al., 2002)
- [23] HARTMANN, M.J.; ASSAD, C.; RASNOW, B.; BOWER, J.M.: *Applications of Video Mixing and Digital Overlay to Neuroethology*. METHODS, vol 21, pp 385-391, 2000. (Hartmann et al., 2000)
- [24] HAYKIN, S.: *Adaptive Filter Theory*. 3^a edição. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1993. (Haykin, 1996)
- [25] HESLOP, K.E.; CURZON, G.: *Effect of reserpine on behavioural responses to agonists at 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, and 5-HT2C receptor subtypes*. Neuropharmacology, Vol 38, pp. 883-91, 1999.(Heslop e Curzon, 1999)

- [26] HUTSON, P.H.; DONOHOE, T.P.; CURZON, G.: *Infusion of the 5-hydroxytryptamine agonists RU24969 and TFMPP into the paraventricular nucleus of the hypothalamus causes hypophagia*. Psychopharmacol, Vol 195, pp. 550-552, 1988. (Hutson et al, 1988)
- [27] IFEACHOR, E.C.; JERVIS, B.W.: *Digital Signal Processing – A practical approach*. 3ª edição. Reading: Addison-Wesley, 1993. (Ifeachor e Jervis, 1993)
- [28] ILLMANN, J.; KLUGE, B.; PRASSLER, E.: *Statistical recognition of motion patterns*. 2002 IEEE/RSJ International Conference on intelligent robots and systems EPFL, Lausanne, Switzerland, 2002. (Illmann et al., 2002)
- [29] INTEL CORPORATION: *Open Source Computer Vision – Reference manual*. OrderNumber 123456-001, <http://developer.intel.com>, 1999. (Intel, 1999)
- [30] JI, L.; YAN, H.: *Robust topology-adaptive snakes for image segmentation*. Image and Vision Computing. Vol 20, pp147-164, 2002. (Ji e Yan, 2002)
- [31] JONG-BAE, K.; HANG-JOON, K.: *Efficient region-based motion segmentation for a video monitoring system*. Pattern recognition letters, Vol 24, pp 113-128, 2003. (Jong-Bae e Hang-Joon, 2003)

- [32] JOURDAN, D.; ALOUNI, A.; ESCHALIER, A.: *Pharmacological validation of an automated method of pain scoring in formalin test in rats*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol 42, pp 163-170, 1999. (Jourdan et al., 1999)
- [33] KAFKAFI, N.; MAYO, C.; DRAI, D.; GOLANI, I.; ELMER, G.: *Natural segmentation of the locomotor behavior of drug-induced rats in a photobeam cage*. Journal of Neuroscience Methods, vol 109, pp 111-121, 2001. (Kafkafi et al., 2001)
- [34] KELLY, A.E.; *Methods in behavioral pharmacology*. Elsevier Science Publishers, pp 499-516, 1993. (Kelly, 1993)
- [35] KELLY, A.E.; CADOR, M.; STINUS, L.: *Exploration and It's Measurement - A Psychopharmacological Perspective*. Neuromethodos, Vol 13, pp 95-144, 1986. (Kelly et al., 1986)
- [36] KLEVEN, M.S., KEOK, W., *Effects of benzodiazepine agonist on punished responding in pigeons and their relationship with clinical doses in humans*. Psychopharmacology 141, pp. 206-212, 1999. (Kleven e Keok, 1999)
- [37] KLETTE, R.; ZAMPERONI, P.: *Handbook of Image Processing Operations*. 1ª edição. John Wiley & Sons Ltd: Bafins Lane, 1996. (Klette e Zamperoni, 1996)

- [38] KOEK, W.; PATOISEAU, J.F.; ASSIÉ, M.B.; COSI, C.; KLEVEN, M.S.; DUPONT-PASSELAIGUE, E.; CARILLA-DURAND, E.; PALMIER, C.; VALENTIN, J.P.; JOHN, G.; PAUWELS, P.J.; TARAYRE, J.P.; COLPAERT, F.C.: *F 11440, a potent, selective, high efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist with marked anxiolytic and antidepressant potential*. J. Pharmacol Exp Ther, vol 287, pp 266-283, 1998. (Koek et al.,1998)
- [39] KOGA, Y.; YOSHIDA, N.; KOBAYASHI, K.; OKAYASU, I.; YAMADA, Y.: *Development of a three-dimensional jaw-tracking system implanted in the freely moving mouse*. Medical Engineering & Physics, Vol 23, pp 201-206, 2001. (Koga et al., 2001)
- [40] LEE, M.D.; CLIFTON, P.G.: *Meal pattern of free feeding rats treated with clozapine, olanzapine, or haloperidol*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, Vol 71, pp 147-154, 2002. (Lee e Clifton, 2002)
- [41] LEW, M.S.; SUBE, N.; HUANG, T.S.: *Improving visual matching*. Computer Vision and Pattern Recognition. Volume: 2, pp. 58-65, 2000. (Lew et al., 2000)
- [42] MCKENNA, S.J.; DURIC, S.J.Z.; ROSENFELD, A.; WECHSLER, H.: *Tracking Groups of People*. Computer Vision and Image Understanding, Vol 80, pp 42–56, 2000. (McKenna et al., 2000)

- [43] MARQUES FILHO, O.; VIEIRA-NETO, H.: *Processamento digital de imagens*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Brasport Livros e Multimídia Ltda, 1999. (Marques Filho e Vieira Neto, 1999)
- [44] NAHAS, T.R.; *O teste do campo aberto*. Técnicas de Sistema Nervoso, pp. 197-215, 1999. (Nahas, 1999)
- [45] National Semiconductor Corporation. Datasheet - LM9627 Color CMOS Image Sensor VGA 30 FPS. On-line www.national.com, 2000.
- [46] NEVES, J; HACKL, L.P.N.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A.;MARINO-NETO; J.: *Central injections of noradrenaline and adrenaline differentially affect plasma free fatty and glucose in conscious pigeons (Columba livia)*. J Comp Physiol B, USAB, v.170, p.379-386, 2000. (Neves et al., 2000)
- [47] NICKELS, K.; HUTCHINSON, S.: *Measurement error estimation for feature tracking*. International Conference on Robotics & Automation, proceeding. IEEE. pp. 3230-3235, Detroit, 1999. (Nickels e Hutchinson, 1999)
- [48] NICKELS, K.; HUTCHINSON, S.: *Estimation uncertainty in SSD-based feature tracking*. Image and Vision Computing. Vol 20, pp. 47-58, 2002. (Nickels e Hutchinson, 2002)

- [49] OLSON, C.F.: *Maximum-Likelihood Template Matching*. IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, Proceedings, 2000. (Olson, 2000)
- [50] PALANZA, P.: *Animal models of anxiety and depression: how are females different?* Neuroscience and Behavioral Review. 25, pp. 219-233, 2001 (Palanza, 2001)
- [51] PRUT, L.; BELZUNG, C.: *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review*. European Journal of Pharmacology , Vol 463 , pp 3– 33, 2003. (Prut e Belzung, 2003)
- [52] QUEN-ZONG, W.; BOR-SHENN, J.: *Background subtraction based on logarithmic intensities*. Pattern Recognition Letters, Vol 23, pp 1529-1536, 2002. (Quen-Zong e Bor-Shenn, 2002)
- [53] REX A., VOIGT P., VOIT M., FINK H.: *Pharmacological Evalution of a Modified Open-Field Test Sensitive to Anxiolytic Drugs*, Pharmacology Biochemistry and behavior. 59, pp. 677-683, 1998. (Rex et al., 1997)
- [54] REITER ,L.W.; MACPHAIL, R.C.; *MotorActivity: A survey of methods with potential use in toxicity testing*. Neurobehavioral Toxicology, Vol 1, Supl. 1 pp 53-66, 1979.

- [55] SAMS-DODD, F.: *Automation of the social test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment*. Journal of Neuroscience Methods, Vol 59, pp 157-167, 1995. (Sams-Dodd, 1995)
- [56] SCHWARTING, R.K.W.; GOLDENBERG,R.; STEINER, H.; FORNAGUERA, J.; HUSTON, J.P.: *A Video image analyzing system of open-field behavior in rat focusing on behavioral asymmetries*. Journaiss of neuroscience methods , Vol 49, pp. 199-210, 1993. (Schwartz et al. , 1993)
- [57] SCHWARZ, S.; HOFMANN, M.H.; GUTZEN, C.; SCHALAX, S.; EMDE, G.D.: *Viewer: a program for visualising, recorder, and analysing animal behaviour*. Computer and Programs in Biomedicine, Vol 67, pp 55-66, 2002. (Schwarz et al., 2002)
- [58] SILVA, A.A.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A.: *Feeding induced by microinjections of NMDA and AMPA-kainate recedtor antagonists into ventral striatal and ventral appllidal áreas os the pigeon*. Brain Research, vol 966, pp76-83, 2003. (Silva et al., 2003)
- [59] SPINK, A.J.; TEGELENBOSCH, R.A.J.; BUMA, M.O.S.; NOLDUS, L.P.J.J.: *The EthoVision video tracking system – A tool for behavioral phenotyping of transgenic mice*. Physiology & Behavior, Vol 73, pp 731-744, 2001. (Spink et al., 2001)

- [60] TABB, K.; DAVEY, N.; ADAMS, R.; GEORGE, S.: *The recognition and analysis of animate objects using neural networks and active contour models*. Neurocomputing, vol 43, pp. 145 –172, 2002. (Tabb et al., 2002)
- [61] TEXAS Instruments Incorporated: *Video and Imaging Solutions Guide*, Dallas: edição on line (www.ti.com/visg), 2002.
- [62] VOS, B.P.; HANS, G.; ADRIAENSEN, H.: *Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in territory of the rat's infraorbital nerve*. International Association for the Study of Pain, vol 76, pp173-178, 1998. (Vos et al., 1998)
- [63] WON KIM; CHOON-YOUNG, L.; JU-JANG, L.: *Tracking moving object using Snake's jump based on image flow*. Mechatronics. Vol 11, pp. 199-226, 2001. (Won et al., 2001)